



(51) 国際特許分類6

C12N 9/12, 15/54, C12Q 1/48

A1

(11) 国際公開番号

WO98/07838

(43) 国際公開日

1998年2月26日(26.02.98)

(21) 国際出願番号

PCT/JP97/02904

(22) 国際出願日

1997年8月21日(21.08.97)

(30) 優先権データ

特願平8/219761

1996年8月21日(21.08.96)

JP

特願平9/18878

1997年1月31日(31.01.97)

JP

特願平9/31807

1997年2月17日(17.02.97)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

三菱化学株式会社

(MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP]

〒100 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)

石川冬木(ISHIKAWA, Fuyuki)[JP/JP]

〒222 神奈川県横浜市港北区篠原台町3-16-105 Kanagawa, (JP)

中村秀男(NAKAMURA, Hideo)[JP/JP]

高橋和展(TAKAHASHI, Kazuhiro)[JP/JP]

藤野泰寛(FUJINO, Yasuhiro)[JP/JP]

原田直純(HARADA, Naozumi)[JP/JP]

〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社 横浜総合研究所内 Kanagawa, (JP)

(74) 代理人

弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.)

〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号

藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Title: HIGHER ANIMAL TELOMERASE PROTEIN AND GENE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称 高等動物テロメラーゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子



(57) Abstract

A telomerase protein originating in higher animals involving human being. This protein and a gene encoding the same are useful in, for example, the clarification of biological control mechanisms such as cell growth and aging and expected to be applicable to, in particular, the development of remedies for cancer. A method for screening substances acting on the expression of the enzyme activity of the higher animal telomerase protein involves the step of measuring the molecular weight of the telomerase protein contained in cells or tissues in contact with a test substance by, for example, the SDS polyacrylamide electrophoresis method.

(57) 要約

ヒトを含む高等動物由来のテロメラゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子が提供される。テロメラゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子は、例えば、細胞増殖及び細胞の老化などの生体制御機構の解明に有用であり、癌の治療薬の開発に特に有用性が期待される。また、高等動物テロメラゼ蛋白質の酵素活性発現に作用する物質のスクリーニング方法であって、被験物質と接触させた細胞又は組織に含まれるテロメラゼ蛋白質の分子量を例えばSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により測定する工程を含むスクリーニング方法が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GU	グアム	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

高等動物テロメラーゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子

技術分野

本発明は高等動物細胞のテロメラーゼの蛋白質をコードする遺伝子及びその遺伝子産物に関するものである。

背景技術

動物細胞などの真核細胞染色体の線状 DNA の両末端はテロメアと呼ばれ、特殊な DNA 配列とそれに結合する蛋白質からなる複雑な高次構造をとっている。テロメア DNA は、チミン(T) 及びグアニン(G) (反対鎖はアデニン(A) 及びシトシン(C)) の豊富な特徴的繰り返し配列からなり、例えば、脊椎動物細胞染色体のテロメア DNA は TTAGGG (反対鎖は CCCTAA) の 6 塩基の繰り返しで構成されている。この配列を利用したサザンブロッティング解析により、ヒト体細胞のテロメア繰り返し配列の平均長は 7 キロ～10 キロベースであることが明らかにされた。

テロメア構造は染色体の安定化に重要な機能を有すると考えられている。例えば、テロメアが細胞核の辺縁に位置することが酵母を用いた形態学的研究で明かにされており、テロメアが染色体を核の特定の位置に固定する「錨」として作用し、細胞核内で各染色体間の物理的相互作用を制御している可能性が示唆されている。また、以下のように、真核細胞の線状二本鎖 DNA の複製ごとの短縮化による染色体機能の不活化を防ぐ機能を有することが示唆されている。

線状二本鎖 DNA の両鎖の同時複製の過程では、一方の DNA 鎖 (リーディング鎖) が 3' 末端をプライマーとして 5' → 3' DNA ポリメラーゼにより連続的に複製されるのに対し、他方の DNA 鎖 (ラギング鎖) では小さい RNA プライマーを用いた断続的なものになる。従って、新生鎖 (ラギング鎖) の 5' 末端の RNA プライマーは DNA に置き換えられないので、細胞分裂を繰り返す毎に一方の娘細胞の 5' 末端が次第に短縮することになり、最後には染色体が不安定になって細胞が死に至る。しかしなが

ら、生殖細胞系列ではDNAの繰り返し複製によって染色体機能が損なわれるような染色体DNAの短縮化が生じないことが明らかにされており (Allsopp, R.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 10114, 1992)、テロメアやそれに隣接する領域がヘアピン構造を採ったり、短縮化に対する緩衝帯として機能している可能性が示唆されている。

テロメアが染色体の短縮化を防ぐ機能を有することは、細胞の老化・不死化とテロメア繰り返し配列の平均長の変化との関係からも強く示唆されている。多細胞生物の線維芽細胞などをイン・ビトロで継代培養すると、継代を経るにつれて増殖能が低下し、最終的には増殖能を失った「老化」細胞となるが、予め細胞内にある種の癌遺伝子を導入しておくで永久増殖能を獲得した不死化細胞が得られる場合がある。これらは細胞レベル (イン・ビトロ) での老化現象及び発癌のモデルと理解されているが、分子レベルでの研究により、正常細胞では分裂回数の増加につれてテロメア繰り返し配列の平均長が短縮化し、その平均長は継代可能回数と相関すること、並びに、不死化細胞ではテロメア繰り返し配列の平均長が短い、継代中にその平均長が変化しないことが明らかにされた。

テロメア繰り返し配列平均長の制御機構の一つとして、テロメア繰り返し配列を伸長させる RNA依存性 DNAポリメラーゼ (テロメラーゼ) が注目されている。この酵素は、原生動物テトラヒメナの大核抽出液中から、テトラヒメナのテロメア繰り返し配列由来の合成オリゴヌクレオチド (TTGGGG) の3'端に同じ6塩基の繰り返し配列を付加する酵素として見いだされたものであり、活性に必要なサブユニットとしてテロメアDNA配列の5'-TTAGGG-3'に相補的な鋳型RNAを含み、鋳型RNAを基にしてテロメアDNAの一本鎖を延長する一種の逆転写酵素である。テトラヒメナ・テロメラーゼ由来のテロメラーゼが精製され、そのcDNAがクローニングされた (Collins, K. et al., Cell, 81, 677, 1995)。このテロメラーゼは鋳型RNAと結合する80 kDのサブユニット及びプライマーとなるDNA末端に結合する95 kDのサブユニットからなり、RNAウイルスのRNAポリメラーゼに比較的類似の一次構造を有することが明かにされた。

テロメラーゼの生物学的意義は、テトラヒメナや酵母などの下等真核生物で明

らかにされた。すなわち、テトラヒメナ・テロメラーゼRNA 遺伝子のテロメア繰り返し配列の鋳型部分に点突然変異を導入した遺伝子で形質転換された個体では、導入されたある種の点突然変異に対応する変異テロメア繰り返し配列が生合成されると同時に増殖不可能になる。また、パン酵母・テロメラーゼ RNA遺伝子である TLC1 が破壊されると、継代を重ねるにつれてその酵母のテロメア繰り返し配列平均長が短くなり、最終的には増殖不可能となる。従って、単細胞真核生物ではテロメラーゼが細胞増殖に必須の酵素であると理解されている。

イン・ビトロでのヒト細胞の不死化過程において、テロメラーゼ活性が癌遺伝子導入後の継代初期には認められず、無限増殖能を獲得した細胞集団において検出されることが明らかにされた。また、実際のヒト癌細胞のほとんどにテロメラーゼ活性が検出される一方で、多くの正常細胞ではテロメラーゼ活性は検出されないと言われている。これらの知見から、癌細胞は、その成立過程においてテロメラーゼ活性の発現によりテロメアDNA の短縮化を免れ、永久増殖能を獲得するのではないかの推測が可能である。従って、テロメラーゼ阻害剤が選択性の高い抗癌剤として有用であり、テロメラーゼ活性の測定により癌の早期診断が可能になると予測される。

テロメラーゼRNAサブユニットの発現の程度は必ずしもテロメラーゼ活性に相関しないという報告がある(Avilonら、Cancer Res. , 56、645、1996)。しかしながら、現在のところ、ヒトを含めた高等動物においてはテロメラーゼ自体が未だ分離・精製されておらず、その物質的実態は不明のままであり、しかも、実際にテロメラーゼ活性を検出するためにはPCRを用いた煩雑な検出法を用いる必要があるので、テロメラーゼについての酵素学的研究はほとんどなされていないのが現状である。さらに、病理切片などを用いてテロメラーゼ活性の発現を個々の細胞レベルで判定することもできないため、テロメラーゼと癌の悪性度との正確な関係を解析することは困難である。

従って、テロメラーゼ蛋白質を単離・同定することによって、高等動物テロメラーゼの物質的特徴を解明するとともに、酵素学的見地からテロメラーゼの阻害剤の研究を行い、テロメラーゼと癌の悪性度との関係を解明することが強く望ま

れている。

発明の開示

そこで本発明者らは、高等動物テロメラーゼ蛋白質を単離・同定するべく鋭意検討を重ね、高等動物テロメラーゼ蛋白質をコードする遺伝子のクローニングに初めて成功し、さらにその遺伝子から遺伝子産物である高等動物テロメラーゼ蛋白質を発現させることに成功した。また、この遺伝子産物を特異的に認識する抗体を作製し、これを用いてテロメラーゼ活性とこの遺伝子産物との密接な関係を証明することにも成功した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。なお、最近、ヒト・テロメラーゼ蛋白質の全長のアミノ酸配列が報告されたが (Science, 275, pp. 973-977, February 14, 1997)、c-DNA の塩基配列及びアミノ酸配列は本発明者らが解明したものと多くの部分で相違している。

本発明は、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で特定されるポリペプチドを提供するものであり、該ポリペプチドはラット由来テロメラーゼ蛋白質であることを特徴としている。また、本発明により、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質として機能することを特徴とするポリペプチドが提供され、その好ましい態様により、ヒトの生体内でテロメラーゼ蛋白質として機能することができる上記ポリペプチドが提供される。

また、本発明の別の態様により、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で特定されるポリペプチドが提供されるが、このポリペプチドはヒト由来テロメラーゼ蛋白質の部分ポリペプチドであることを特徴としている。さらに本発明により、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質の部分ポリペプチドとして機能することを特徴とするポリペプチドが提供される。

さらに本発明の別の態様により、配列表の配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列

で特定されるポリペプチドが提供されるが、該ポリペプチドはヒト由来テロメラーゼ蛋白質であることを特徴としている。また、本発明により、配列表の配列番号 13 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質として機能することを特徴とするポリペプチドが提供され、その好ましい態様により、ヒトの生体内でテロメラーゼ蛋白質として機能することができる上記ポリペプチドが提供される。

さらに本発明の別の態様によれば、上記の各ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が提供される。このヌクレオチド配列としては、DNA 配列又は RNA 配列を挙げることができ、例えば、その好ましい態様として、配列表の配列番号 1 に記載の DNA 配列の核酸番号 199 から核酸番号 8085（終始コドンを含まず）で特定される DNA、又は配列表の配列番号 2 に記載の DNA 配列の核酸番号 1 から核酸番号 487 で特定される DNA、又は配列表の配列番号 13 に記載の DNA 配列の核酸番号 156 から核酸番号 8030（終始コドンを含まず）で特定される DNA が提供される。以上に加えて、上記 DNA 配列を含む組み換えベクター、該組み換えベクターが導入された形質転換体、及び、該形質転換体を培養した培養物から上記 DNA 配列の遺伝子産物であるポリペプチドを分離・採取する工程を含む、上記ポリペプチドの製造方法も提供される。

本発明のさらに別の態様として、上記の各ポリペプチドを特異的に認識することができる抗体、上記の各ヌクレオチド配列の一部又は全部に相補的に結合可能なヌクレオチド配列を含む核酸プローブが提供されるが、これらの抗体又は核酸プローブは癌細胞検出用試薬として有用であり、上記抗体又は核酸プローブを含む癌診断用の医薬組成物が本発明の一態様として提供される。

これらの発明に加えて、本発明の別の態様により、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）-ポリアクリルアミド電気泳動法（PAGE）による分子量が、不活性型では約 240 kDa であり、活性型では約 230 kDa であることを特徴とする上記ポリペプチドと、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約 230 kDa であることを特徴とする活性型のポリペプチドが提供される。ま

た、高等動物テロメラゼ蛋白質の酵素活性の発現に作用する物質のスクリーニング方法であって、被験物質と接触させた細胞又は組織に含まれる高等動物テロメラゼ蛋白質のサブユニットであるポリペプチドの分子量を測定する工程を含む方法も提供される。

上記方法の発明の好ましい態様によれば、被験物質との接触工程を被験物質の存在下における培養工程又は動物への被験物質の投与工程により行う上記方法；分子量の測定をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で行う上記方法；約240kDaの不活性型ポリペプチド及び約230kDaの活性型のポリペプチドの存在比を測定する工程を含む上記方法；被験物質の非存在下における240kDaのポリペプチドの存在比と比較して、該ポリペプチドの存在比が被験物質の存在下において実質的に増加している場合には、該被験物質が高等動物テロメラゼ蛋白質の酵素活性の発現を阻害する物質であると判定する工程を含む上記方法；並びに、被験物質の非存在下における230kDaのポリペプチドの存在比と比較して、該ポリペプチドの存在比が被験物質の存在下において実質的に増加している場合には、該被験物質が高等動物テロメラゼ蛋白質の酵素活性の発現を活性化する物質であると判定する工程を含む上記方法が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、ラット・テロメラゼ蛋白質遺伝子のcDNAクローンの制限酵素切断地図を示した図である。

第2図は、PCRによって増幅されたヒト・テロメラゼ蛋白質遺伝子のcDNA断片のDNA配列と、予想されるアミノ酸配列について、それぞれラットのもの又はテトラヒメナp80との相同性を比較した結果を示した図である。図中、Rはラット遺伝子、Hはヒト遺伝子、p80はテトラヒメナp80遺伝子を示す。

第3図は、組み換えラット・テロメラゼ蛋白質断片に対する特異抗体をコートしたビーズを用いて、ヒト癌細胞(PA-1)またはラット癌細胞(AH66F)抽出液由来のテロメラゼ活性が免疫沈降させた結果を示した図である。PCRとELISAを組み合わせた方法を用いて検討した結果を示してあり、縦軸はテ

ロメラゼ活性を表し、「ビーズのみ」は抗体をコートしていない陰性対照、「P I - 1」は免疫前血清由来 I g G をコートした陰性対照を示す。「1 - 4 1 d」と「R 1 - 1 1 6 d」は過免疫血清由来特異 I g G をコートしたサンプルの結果を示す。

第4図は、ヒト・テロメラゼ蛋白質遺伝子の c D N A クローンの制限酵素切断地図を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のポリペプチドの第一の態様は、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で特定され、マウス由来のテロメラゼ蛋白質を構成するポリペプチドに相当するものである。本発明により提供される上記ポリペプチドは、配列番号 1 に記載された特定のポリペプチドに限定されることはなく、配列表の配列番号 1 に示されたアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、ヒトを含む高等動物のテロメラゼ蛋白質として実質的に機能することができるポリペプチドも本発明の範囲に包含される。また、このようなポリペプチドをサブユニットとして含む高等動物テロメラゼ蛋白質も本発明の範囲に包含される。

本発明のポリペプチドの第二の態様は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で特定され、ヒト由来のテロメラゼ蛋白質を構成するポリペプチドの部分ポリペプチドに相当するものである。本発明により提供される上記ポリペプチドは、配列番号 2 に記載された特定のポリペプチドに限定されることはなく、配列表の配列番号 2 に示されたアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的に高等動物、好ましくはヒトのテロメラゼ蛋白質の部分ポリペプチドとして機能することができるポリペプチドも本発明の範囲に包含される。

本発明のポリペプチドの第三の態様は、配列表の配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列で特定され、ヒト由来のテロメラゼ蛋白質を構成するポリペプチドに相当するものである。本発明により提供される上記ポリペプチドは、配列番号 1 3 に

記載された特定のポリペプチドに限定されることはなく、配列表の配列番号13に示されたアミノ酸配列に1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、ヒトを含む高等動物のテロメラーゼ蛋白質として実質的に機能することができるポリペプチドも本発明の範囲に包含される。また、このようなポリペプチドをサブユニットとして含む高等動物テロメラーゼ蛋白質も本発明の範囲に包含される。

本発明のポリペプチドには、上記の各ポリペプチドを部分配列として含むポリペプチドも包含される。例えば、上記の各ポリペプチドに対してその発現効率を向上させる性質を有する適宜のアミノ酸配列を結合させたポリペプチド、上記の各ポリペプチドに対してシグナル配列を結合させたポリペプチド、上記ポリペプチドの発現を確認するために読み枠が変わらないように他の蛋白質と上記ポリペプチドとを結合させた、いわゆるタグ配列との融合蛋白質なども本発明の範囲に包含される。

上記のポリペプチドのうちのいずれかをコードするヌクレオチド配列は、いずれも本発明のヌクレオチド配列に包含される。本発明のテロメラーゼ蛋白質をコードする遺伝子（本明細書において「テロメラーゼ蛋白質遺伝子」という場合があり、テロメラーゼ蛋白質を構成するポリペプチドの全長又はその一部をコードするヌクレオチド配列を意味するものとして用いる）としては、上記の第一の態様、第二の態様、及び第三の態様に包含されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列を挙げることができる。

本明細書において「高等動物」という用語は、ヒトを含む哺乳類動物を包含する概念として用いる。このような高等動物、好ましくは哺乳類動物に由来するテロメラーゼ蛋白質を構成するポリペプチドは、それぞれ高い相同性を有していることが期待される。従って、本明細書に詳細に開示されたマウス由来のテロメラーゼ蛋白質遺伝子についてのクローニング方法及びその遺伝子の情報を基にすれば、当業者は高等動物由来のテロメラーゼ蛋白質を構成するポリペプチドをコードする遺伝子を容易に入手できるとともに、その遺伝子産物を取得することが可能であることはいうまでもない。

本発明のテロメラーゼ蛋白質遺伝子は、例えば次のような方法によって得られる。本発明のテロメラーゼ蛋白質遺伝子を含有するDNAライブラリーとしては、不死化した高等動物細胞株、好ましくはヒト、サル、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどの細胞株から調製したRNAを用いて公知の常法により作成したプラスミドcDNAライブラリー若しくはファージcDNAライブラリー、又はファージゲノミックライブラリーなどが利用できる。

例えば、ファージcDNAライブラリーを用いる場合には、まず、癌などの組織、あるいは不死化した高等動物細胞株を液体窒素中で粉碎し、グアニジンイソチオシアネート水溶液等中でホモジナイズした後、Chirgwinらの方法[Biochemistry 18、5294-5299(1979)]に従って塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって全RNAを沈澱として分離する。RNAの分離には市販のRNAzol(TelTest社)などの抽出試薬を使用することもできる。RNAの分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により全RNAを精製し、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーに付して精製することにより、目的のテロメラーゼ蛋白質のmRNAを含むポリ(A)含有mRNA(polyA⁺mRNA)群を調製することができる。

次に、上記で調製したmRNA群に対して、例えば、デオキシチミジンが12個から18個連結したいわゆるOligo(dT)配列自体、又はネーチャー[Nature 329、836-838(1987)]に記載されているようなOligo(dT)配列を含有するような合成DNAにより構成されるプライマーDNAをハイブリダイズさせ、逆転写酵素により1本鎖cDNAを合成する。市販のcDNAの合成キットにもこれに類する配列が利用されているので、そのような配列を用いてもよい。その後、市販プライマーに対するPCR反应用の合成DNA(通常はキットに添付されているもの自体)を用いてPCR反応を行えば良い。また、前記文献[Nature 329、836-838(1987)]に記載されているようなプライマーDNAを用いる場合には、その配列に相補的な配列を設計し、PCR反应用のプライマーとしてあらかじめ用意しておくことが好ましい。その後、大腸菌のDNAポリメラーゼI、大腸菌のDNAリガーゼ、

RNase Hを用いて、常法に従って2本鎖cDNAを合成する。次いで、T4DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、いわゆるEcoRIアダプター等の、制限酵素により切断された形をなすDNAの小断片をT4DNAリガーゼによりcDNA鎖の両末端に付加する。

この際、例えばEcoRIメチレーズ等のDNAメチレーズでcDNA中の制限酵素切断点をメチル化し（例えば、EcoRIメチレーズの場合はEcoRI切断点のメチル化を行い）、制限酵素EcoRIの切断からcDNAを保護しておき、次に、cDNAの末端に、いわゆるEcoRIリンカー等をT4DNAリガーゼにより付加した後、制限酵素EcoRIでリンカーDNA部分のみを切断しても同様な結果が得られる。ベクターのクローニングサイトとして、例えばBamHIなどの他の制限酵素の切断点を選択する場合には、前述の一連の末端処理の操作を、例えばBamHIアダプターの結合もしくはBamHIメチレーズ、BamHIリンカー、BamHI等の組み合わせで処理にすることによっても同様な結果を得ることができる。

上記の様に末端処理されたcDNA鎖を市販のλファージベクター、例えばλZAP（Promega Biotech社）等のλファージベクターまたはpGEM2（Promega Biotech社）等のプラスミドベクターのEcoRI切断部位に常法に従って挿入することにより、組換えλファージDNA群または組換えプラスミドDNA群を製造することができる。あるいは、PCR反応を用いて断片を取得する場合には、PCR反応により増幅されたDNAの断片の末端に特異的に〔A〕が付加されるために、それに相補的な〔T〕を付加したベクター、例えばpCRII（Invitrogen社）やpT7（Novagen社）などのベクターを用いて製造することができる。

このようにして得られた組換えλファージDNA群を材料として、市販のイン・ビトロ・パッケージング・キット、例えばギガパック・ゴールド（プロメガ・バイオテック社）などを用いていわゆるイン・ビトロ・パッケージングを行い、組換えλファージDNAを有するλファージ粒子を製造することができる。パッケージングは、一般には、市販のキットの添付説明書の条件に従って行えばよい。得

られたλファージ粒子を常法、例えばT. Maniatisらの方法（「Molecular Cloning」、Cold Spring Harbor Laboratories 1982年）に従い、例えば大腸菌などの宿主に形質導入し、得られた形質転換体を増殖させることによってファージcDNAライブラリーを作ることができる。また、組換えプラスミドDNA群では、常法に従い、例えば大腸菌などの宿主に形質転換し、得られた形質転換体を増殖させることによって、プラスミドcDNAライブラリーを得ることができる。

次に、これらファージあるいは大腸菌などの形質転換体を増殖させ、例えばジンスクリーンプラス（DuPont社）などのナイロン膜あるいはニトロセルロース膜上に移し取り、アルカリ存在下で蛋白を除くことにより調製したλファージDNAあるいはプラスミドDNAに対して、後述の方法で増幅された高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の部分断片から作製した $[^{32}\text{P}]$ 標識プローブをハイブリダイズさせ、プラークハイブリダイゼーション法によって選択し、目的とする高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子をコードするcDNAクローンの全部または一部を得ることができる。

ファージcDNAライブラリーまたはプラスミドcDNAライブラリーから目的とする高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子をコードするcDNAクローンを選択する為に用いるプローブは、常法に従い、例えば市販のキット等を用いて調製することができる。例えば、既知のテロメラーゼ蛋白質（Collinsら、Cell、81、677-686、1995）をコードする遺伝子に由来するDNA配列や、そのアミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列をコードし得る別の生物の遺伝子のDNA配列をNational Center for Biotechnology Information（NCBI）などの遺伝子バンク中でTBLASTNなどのプログラムを用いて検索し、ある程度相同性を有するアミノ酸配列について、それをコードし得るDNA配列を参考にしてオリゴヌクレオチドを合成してプローブとして用いることができる。また、同様な遺伝子のDNA配列を基にPCRプライマーを設計し、いわゆるdegenerative PCR法によって、より長いDNAを取得してプロー

ブとして用いてもよい。この場合、PCR法に用いる鋳型には、目的のプロブDNAを含む細胞由来のファージcDNAライブラリー、プラスミドcDNAライブラリー、または抽出したRNAから常法に従って合成したcDNAなどを用いることができる。

また、上記のように遺伝子ライブラリーをハイブリダイゼーション法でスクリーニングせずに、プロブDNAを設計したようにPCRプライマーを設計し、いわゆるPCR法で高等動物のテロメラーゼ蛋白質遺伝子の一部を取得することもできる。その場合、PCR法に用いる鋳型としては、前述のファージcDNAライブラリー、プラスミドcDNAライブラリーの他、不死化細胞より抽出したRNAから常法に従って合成したcDNAを直接用いることができる。PCR反応後、反応液をアガロースやポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析し、二種類のプライマーにより増幅されるDNA断片の中から、予想される大きさの断片を回収、精製し、例えばpCR-ⅠⅠの様なPCR断片を直接組み込むことができる市販のベクターに結合し、得られた組み換えベクターで大腸菌などの宿主を形質転換して塩基配列の解析に用いることができる。さらに、得られた高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の部分配列を基にして新たにPCRプライマーを設計、合成し、高等動物テロメラーゼ蛋白質の配列を基に設計したPCRプライマー、あるいはcDNAを合成する際に用いるプライマーに対して相補的な配列のプライマー、またはcDNAの両端に付加したアンカー配列に対応するPCR用プライマー、cDNAが組み込まれたベクターに対するプライマーと、新たに合成した上記プライマーとの間でDNAの増幅を繰り返すことによって高等動物テロメラーゼ蛋白質の全長をコードする遺伝子を取得することもできる。

PCR反応の終了後、DNAの断片をアガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動に付して常法に従って解析、回収、及び精製を行うことができる。得られた精製DNA断片を、例えばpCR-ⅠⅠの様なPCR断片を直接組み込むことができるベクターに挿入し、得られた組み換えベクターで大腸菌を形質転換して常法に従ってDNAを調製し、Sangerらのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74、5463、1977年〕によって

目的DNA断片の塩基配列を決定することができる。配列の決定はA B I 3 7 3 A (アプライド・バイオ・システムズ社) の様な自動シーケンサーによって行うこともできる。

またファージライブラリーやプラスミドライブラリーから得られたクローンの場合、一般的には、自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定できる配列長には限界があるため、ベクターに挿入されたcDNAの全領域を一度に解析することが困難な場合がある。このような場合には、断片を適当な制限酵素で切断した後、断片をゲル電気泳動で分離、回収し、さらに回収した断片を適宜のベクターに挿入し直すことにより解析を容易にすることができる。このような操作(サブクローニング)の他、自動シーケンサーが決定した塩基配列の中から適当な配列を選び、新たなプライマーを設計して、そこから先を継続して解析することもできる。このようにして決定されるDNA断片の配列を互いに重なるようにつなぎ合わせることにより、例えば、配列表の配列番号1または13に記載したような高等動物テロメラーゼ蛋白質を構成する全長ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は配列表の配列番号2に記載したような高等動物テロメラーゼ蛋白質を構成する部分ポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を決定することができる。

本発明のヌクレオチドにはDNA及びRNAが包含されるが、配列表の配列番号1、13、及び2には、それぞれ、ラット及びヒト由来テロメラーゼ蛋白質を構成する全長ポリペプチドをコードするDNA配列、並びにヒト由来テロメラーゼ蛋白質を構成する部分ポリペプチド配列をコードするDNA配列を好ましい態様として記載した。本発明のヌクレオチドには、上記の配列番号1、13、及び2により特定されるDNA配列のほか、それらがコードするポリペプチドのアミノ酸配列に対して1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が導入されており、実質的に高等動物テロメラーゼ蛋白質の全長又は部分ポリペプチドとして機能するポリペプチドをコードするヌクレオチドが包含される。このようなアミノ酸残基の置換、挿入、及び／又は欠失等によるアミノ酸配列の改変は、例えば、Nucleic Acid Res., Vol. 10, 6487

-6500 (1982)、Methods in Enzymol., Vol. 217, 218-227 (1993), 同Vol. 217, 270-278 (1993)等に記載の部位特異的変異技術により行うことができるが、これらの方法に限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を用いてもよい。

以上のようにして得られた高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子DNAの少なくとも一部分をハイブリダイゼーション・プローブまたはPCRプライマーとして用いることにより、他の種の高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を同様な方法で単離することができる。例えば、テトラヒメナ・テロメラーゼ蛋白質 (p80) とラット・テロメラーゼ蛋白質のアミノ酸配列の相同性の最も高い部分に由来するPCRプライマーを用いて、対応する部分のヒト・テロメラーゼ蛋白質のアミノ酸配列を明らかにすることも可能であり、さらにはその全長cDNAを得ることもできる。

上記のようにして得られる高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子DNA又はそのDNA断片は、その両端あるいはどちらか一端を改変し、またはそれ自体で、公知の発現ベクターにそれ自体公知の方法でプロモーターの下流に挿入することができ、このようにして製造される遺伝子発現用の組み換えベクターを、大腸菌、酵母、動物細胞宿主等、公知の細胞中にそれ自体公知の方法により導入して形質転換体を製造することができる。

本発明の高等動物テロメラーゼ蛋白質の産生方法につき詳細に説明すると、発現ベクターとしては、上記のようにして得られた高等動物テロメラーゼ蛋白質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。

高等動物テロメラーゼ蛋白質の工業的生産のためには、安定した宿主-ベクター系を構築すること、さらに生物学的に活性を有する高等動物テロメラーゼ蛋白質を発現しうる系を用いる必要がある。高等動物テロメラーゼ蛋白質は比較的大きな蛋白質であり、そのリフォールディングが生理活性の獲得に重要である。一般的には、リフォールディングを考慮した場合、宿主として動物細胞を用いること

が有利である。高等動物テロメラーゼは、数種の蛋白質及びRNAサブユニットからなる複合体として存在する可能性があり、生理活性のある高等動物テロメラーゼとして組み換え体から精製する場合には、導入する高等動物テロメラーゼ蛋白質の由来する生物種と宿主細胞の由来する生物主の一致することが好ましい。もっとも、高等動物テロメラーゼ蛋白質を大腸菌で生産させた後、活性を有する複合体として *in vitro* で他の構成成分と再構成することが可能であることはいうまでもない。

動物細胞としては、例えばCHO細胞（生物種：ハムスター）、COS細胞（生物種：サル）、NIH3T3細胞（生物種：マウス）、Rat-1（生物種：ラット）細胞、VA-13（生物種：ヒト）細胞等が挙げられる。これらの細胞を宿主とした発現用プラスミドは、プロモーターとしてはSV40プロモーター由来またはウイルス遺伝子由来のプロモーターが好ましい。この下流に高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を5'側から挿入する。また高等動物テロメラーゼ蛋白質の生産量を上げるために、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を5'側から2～3個つなげたものを挿入してもよいし、各高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の5'側にSV40などのプロモーターを挿入したものを2～3個つなげてよい。この高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の下流にポリアデニル化部位を含むことが好ましく、例えばSV40 DNA、 β -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のものを用いることができる。

このような発現ベクターは、例えばCHO細胞などの動物細胞に形質転換した際の選択マーカーを有していてもよい。選択マーカーを用いる場合には、例えば、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子、ネオマイシン誘導体G-418耐性遺伝子などを用いることができる。各耐性遺伝子の5'側に例えばSV40由来のプロモーターが挿入されており、各耐性遺伝子の3'側にポリアデニル化部位が含まれていることが好ましい。高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現ベクターに対してこれらの耐性遺伝子を挿入する場合、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子のポリアデニル化部位下流に挿入すればよい。また、発現ベクターは形質転換体の選択マーカーを有していなくてもよい。この場合には、高等動物テロメラー

ゼ蛋白質の発現ベクターと共に形質転換体選択のマーカ―を有するベクター、例えば pSV2neo、pSV2gpt、pMTVdhfr などを用いて二重形質転換することが好ましい。

上記の高等動物テロメラーゼ蛋白質発現ベクター、またはそれに加えて形質転換体選択マーカ―を有するベクターにより形質転換した動物細胞を選択するためには、該選択マーカ―の発現による表現形質を利用することができる。さらに、高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現量の上昇を目的として、高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現が確認された細胞に対し、選択マーカ―を変更して形質転換を繰り返してもよい。発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40 初期プロモーター、ウサギの β -グロビン遺伝子に由来するスプライス配列 DNA、ウサギの β -グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、SV40 初期領域からのポリアデニル化部位、並びに pBR322 由来の複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子を含有する pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1528, (1981)) などが挙げられる。

発現ベクターの動物細胞への移入はリン酸カルシウムや cationic lipid を DNA のキャリアとして用いるトランスフェクション法が一般的である。形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI 1640 などを用い、5～10% 血清存在下もしくは適当量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下で培養を行うか、又は無血清下で培養を行うことができる。高等動物テロメラーゼ蛋白質を発現している動物細胞中には高等動物テロメラーゼ蛋白質が大量に存在していると考えられるので、この形質転換体の培養物から得た蛋白抽出液を用いて高等動物テロメラーゼ蛋白質の分離精製を行うことが可能である。生産された高等動物テロメラーゼ蛋白質を含む培養上清は各種クロマトグラフィー、例えば、ヘパリンセファロースもしくはブルーセファロース等を用いたクロマトグラフィーにより精製可能である。

また大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主として用いるときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合 (SD) 配列、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝

子、転写終結配列、およびプロモーターを制御する遺伝子を含むことが好ましい。プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素 (*trp*)、ラクトースオペロン (*lac*)、 λ ファージ PL、PR、T5 ファージの初期遺伝子のプロモーターである P25、P26 プロモーター等が挙げられる。また、これらは例えば *pac* プロモーター [Agric. Biol. Chem. 52、983-988、1988年] のように独自に改変、設計された配列でも良い。

リボゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでもよいが、DNA 合成により作成した 16S リボソーム RNA の 3' 末端領域に相補的な配列を 4 塩基以上連続してもつコンセンサス配列を持ったものでもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、*trp* オペロンターミネーター等を有している方が好ましい。

発現に必要なこれらの因子の発現プラスミド上での配列順序は、例えば、5' 上流から、プロモーター、SD 配列、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子、転写終結因子の順であることが望ましい。また発現ベクター上の SD 配列と高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法 (特開平 1-95798 号公報などに記載の方法) を用いることもできる。

発現した高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを大腸菌などの形質転換体からの簡便に回収、精製するために種々のアフィニティークラムを利用することができる。例えば、ヒスチジンが 6 個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジントグを有する蛋白質がキレートカラムに結合する性質を利用して、プロモーターの下流に例えばヒスチジンが 6 個以上並んだアミノ酸配列をコードする DNA を配置し、さらにその下流に高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を結合することにより、ヒスチジントグを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを発現させることができ、発現した高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドをキレートカラムにより容易に精製することができる。

さらに、ヒスチジントグと高等動物テロメラーゼ蛋白質を構成するポリペプチド又はその部分ポリペプチドとの間に、例えばトロンビン、TEVプロテアーゼ、又は第X因子などのプロテアーゼにより特異的に切断されるポリペプチド配列を組み込み、キレートカラム精製後のポリペプチドを対応のプロテアーゼで処理することにより、天然型の高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを回収することができる。プロテアーゼによる切断後はHPLC等により分離、精製することができる。

上記の他、発現ベクターとして使用できるものとして、pUAI2（特開平1-95798号公報）や市販のpKK233-2（Pharmacia社）等を挙げることができる。また、日本住血吸虫由来グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白として発現させる発現ベクターとしてpGEXシリーズ（Pharmacia社）を利用することができ、ヒスチジン配列を利用した精製が可能なベクターとしてpProEX-1（Gibco BRL）を用いることができる。宿主の形質転換法は、常法に従い行うことができる。また、昆虫細胞としては、例えばInvitrogen社のバキュロウイルス発現キットであるマックスバック（MAXBACTM、BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM MANUAL VERSION 1.4）のマニュアルに従い、このキットを使用することができる。この時、発現量上げるためにポリヘドリンのプロモーターから開始コドンまでの距離を変えることが好ましい。

形質転換体の培養は、当業者に利用可能な常法に従って行うことができる。培養温度としては、28℃～42℃が適当である。ラクトースオペロン（lac）のプロモーターを利用する場合は、菌体培養液の600nmの波長における吸光度がおよそ0.5になったところで、終濃度が1mM程度になるようにIPTGを加えて発現誘導を行うことが必要である。

上記方法で単離・精製された高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを用いて、サル、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウスなどの哺乳類動物を免疫することができ、高等動物テロメラーゼ蛋白質を特異的に認識するポリクロー

ナルまたはモノクローナル抗体を作製することができる。その特異性の検討には、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体の培養液又は遺伝子産物の抽出液を用いることができる。

このような高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドに特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を固定化したアフィニティカラムを用いて、テロメラーゼ活性を有する不死化細胞株または形質転換体の抽出液から、高等動物テロメラーゼ複合体を濃縮・精製することができる。また、テロメラーゼ活性を有する真核動物不死化細胞株に対して、高等動物テロメラーゼ蛋白質とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ポリ・ヒスチジンなどのいわゆる「タグ配列」との融合蛋白質を発現するベクターを導入し、得られた形質転換体の抽出液をグルタチオン・セファロース (Pharmacia 社)、ニッケル・NTA・アガロース (QIAGEN 社) 等の「タグ配列」に特異的に結合するリガンドを固定化したカラムに付して精製することにより、高等動物テロメラーゼ複合体を濃縮・精製することができる。以上のような方法で得られた高等動物テロメラーゼ複合体は、高活性の高等動物テロメラーゼとして阻害剤の評価などに利用することができるほか、新規な構成成分の解析、及びそれらの単離・精製の材料として用いることが可能である。

また、いわゆる「ツー・ハイブリッド (Two-hybrid) 法」に従い、酵母を含む様々な形質転換体を用いて、高等動物テロメラーゼ蛋白質に物理的に強固に結合する蛋白質をコードする遺伝子を単離・同定することができる。このような目的のためには、例えば Clontech 社の「Match Maker キット」などを用いることができる。

上記の高等動物テロメラーゼ蛋白質の特異抗体を用いることにより上記遺伝子の発現の程度を蛋白質レベルで観測することができ、核酸プローブや PCR プライマーを用いて遺伝子レベルでの発現状況を観測することができる。このような方法によれば、癌細胞の検出、並びにテロメラーゼ活性の変化に起因する疾患及びテロメラーゼ活性の変化を伴う疾患の診断が可能である。例えば、患者から分離・採取された試料を適宜の方法で抽出した後、特異抗体を用いた ELISA 法

もしくはウェスタン・ブロット法、核酸プローブを用いたサザンまたはノザン・ブロット法、またはオリゴヌクレオチド・プライマーを用いたPCR法により判定を行うことができる。従って、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができる抗体又は本発明のヌクレオチド配列の一部又は全部に相補的に結合可能なヌクレオチド配列を含む核酸プローブは、癌細胞の検出試薬、又は癌診断用の医薬組成物の有効成分として有用である。

なお、後述の実施例で示したように、ラット由来のテロメラーゼ蛋白質には、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約240kDaの不活性型ポリペプチドと、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約230kDaの活性型ポリペプチドの存在が確認されている。また、約240kDaの不活性型ポリペプチドが最初に発現し、約230kDaの活性型ポリペプチドに変換される機構の存在が証明されている。従って、他の高等動物においても、同様な不活性型及び活性型のポリペプチドが存在しており、不活性型ポリペプチドから活性型ポリペプチドに変換される同様な機構が存在していることが当業者に自明である。これらの分子種（サブユニット）はいずれも本発明の範囲に包含される。

上記の活性型ポリペプチド及び不活性型ポリペプチドの存在比を測定することにより、テロメラーゼの活性化機構に作用する物質をスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、典型的には、被験物質を投与した後の高等動物の組織や細胞、又は培養系において被験物質の存在下で培養を行った高等動物の組織や細胞に含まれる上記の活性型ポリペプチド及び不活性型ポリペプチドの存在比を測定し、被験物質の非存在下での存在比と比較する工程を含んでいる。分子量の測定は、一般的には、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で行えばよい。

例えば、被験物質と接触していない細胞や組織に含まれるテロメラーゼ蛋白質のサブユニットの分子量をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で測定し、約240kDaのポリペプチドと約230kDaのポリペプチドとの存在比をあらかじめ調べておく。つぎに、被験物質を投与し、又は被験物質の存在下で培養を

行うことにより被験物質と接触させた細胞や組織に含まれるテロメラーゼ蛋白質のサブユニットの分子量を同様に測定し、約240kDaのポリペプチドと約230kDaのポリペプチドの存在比を測定する。被験物質と接触した細胞や組織において約240kDaのポリペプチドの存在比が非接触時の場合に比べて実質的に増加していれば、被験物質はテロメラーゼの活性化機構を阻害すると判定できる。一方、約230kDaの蛋白質の存在比が増加していれば、被験物質はテロメラーゼの活性化を促進すると判定できる。このようにしてテロメラーゼの活性化機構に作用することが確認された物質も本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例1：ラット・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の取得

(1) テトラヒメナ・テロメラーゼ・サブユニットp80遺伝子に相同な遺伝子の検索

Internetにて、National Center for Biotechnology Informationのhome pageにアクセスし、TBLASTNプログラムにて、テトラヒメナ・テロメラーゼ・サブユニットp80のアミノ酸配列に相同なアミノ酸配列をコードし得るDNA配列を検索した。その結果、Expression Sequence Tag (EST) DNA配列のデータベースに登録された、ラットPC12細胞由来の機能不明なmRNA配列に相補的なDNA配列(配列表の配列番号3)が、p80の一部のアミノ酸配列に弱い相同性(High Score: 94、Probability: 1.7×10^{-3})を示すアミノ酸配列(下記表1: ラットcDNA)をコードし得ることがわかった(表中、アミノ酸は1文字表記で示し、Xは終始コドンを表す)。

表 1

p 8 0 (N末端側) A V Y I R N E L
 ラット c D N A (N末端側) X A S L Y A R Q Q L

p 8 0 Y I R T T T N Y I V A F C V V H
 ラット c D N A N L R D I A N I V L A V A A L L

p 8 0 K N T Q P F I E K Y F N K A V L
 ラット c D N A P A C R P H V R R Y Y S A I V H

p 8 0 L P N D L L E V C E F A Q V L Y
 ラット c D N A L P S D W N Q V A E F Y Q V W Y

p 8 0 I (C末端側)
 ラット c D N A L (C末端側)

(2) ラット・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の部分断片の取得

(1) で得られた p 8 0 のアミノ酸配列に極めて弱い相同性を示すラット由来のアミノ酸配列については、その上流に終止コドンが存在し、しかもその下流には開始コドンとしてのメチオニンが存在しないことから、このアミノ酸配列をコードする m R N A が実際に存在するものかどうか不明である。また、p 8 0 に相同性を有する蛋白質を生合成できるかどうか自体も不明である。しかし、データバンクに登録された D N A 配列に相補的な D N A 配列がこのアミノ酸配列をコードする可能性があり、実際転写された対応の m R N A はスプライシングを受けて、配列が変化している可能性がある。そこで、ラット由来細胞に実際にこの m R N A が存在するか否かを検討した。

まず、アデノウイルスで形質転換されたラット 3 Y 1 細胞由来 Z 1 9 細胞から、

Chomczynskiの方法 (Anal. Biochem.、162、156-159、1987) によってRNAを調製した。すなわち、Z19細胞 10^8 個を、グアニジンイソチオシアネート溶液 [4 M グアニジンイソチオシアネート (和光純薬)、25 mM クエン酸ナトリウム (和光純薬)、0.1 M 2-メルカプトエタノール、0.5% ザルコシン酸ナトリウム (和光純薬)] 中でホモジナイズし、0.1 容量の2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) を加えて混和した。このホモジュネートに等容量の水飽和フェノール (和光純薬) 及び0.2 容量のクロロホルム (和光純薬) / イソアミルアルコール (和光純薬) 混合液 (49対1、体積比) を加えて10秒間激しく混和し、10、000×g、20分間の遠心分離により上清の水層を回収した。回収した水層に等容量のイソプロパノール (和光純薬) を混和し、-20度で1時間冷却した後、15、000×g、20分間の遠心分離を行った。得られた沈澱物を再びグアニジンイソチオシアネート溶液に溶解し、等容量のイソプロパノールを加え、-20度で1時間冷却した後、15、000×g、20分間の遠心分離により総RNAを回収した。

RNAの精製は以下のように行った。すなわち、0.2 mg の総RNAを1 mM EDTA、20 mM トリス塩酸 (pH 7.5) に溶解し、70℃、5分間の熱処理後、氷上で急冷した。この溶液に5 M NaCl 溶液を終濃度が0.5 M になるように加えて、Oligo-dTセルロースカラム (type 7, 1 cm × 1 cm, Pharmacia 社) に展開し、1 mM EDTA および0.5 M NaCl を含む20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) でカラムを洗浄後、滅菌脱塩水にて結合分画を溶出して4 µg の poly (A)⁺ RNA を得た。

上記のようにして得られた poly (A)⁺ RNA 1 マイクロg を鋳型にして cDNA を合成し、この cDNA に 10 pmole の ランダム・ヘキサマー・プライマー と 200 ユニットの MMLV 逆転写酵素 (『SUPER SCRIPT』、GIBCO BRL) を加えて 1st strand を合成し、次に、1.4 ユニットの RNase H、40 ユニットの 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I 及び 15 ユニットの 大腸菌 DNA ライゲース を加えて 2nd strand を合成した。反応終了後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、上清の水層を回収した。回収

した水層と等容量の5M酢酸アンモニウム溶液を添加後、2倍容量のエタノールを混和した。次に、15、000×g、10分間の遠心分離を行い、エタノール沈澱によるcDNAの回収を行った。

上記のようにして得られたcDNAについて、Rileyらの方法(Vectorette法、Nucleic Acid Res.、18、2887-2890)を用いて、(1)の工程で得られたcDNA配列(配列番号3)に対応する部分のさらに5'側上流に位置する未知のcDNA配列を解析した。まず、60ngのcDNAをT4ポリメラーゼで処理して末端を平滑化し、さらに10ユニットの制限酵素PvuII(東洋紡製、緩衝液は添付のものを使用)と37℃で2時間インキュベートした。切断したDNAをフェノール/クロロホルム処理及びエタノール沈澱にて精製した後、下記表2に示すVectorette unit(vctAとvctBをアニールさせたもの)3pmoleをDNAリガーゼを用いて連結した。

表2

vctA: 5' - AAGGAGAGGACGCTG
 TCTGTCGAAGGTAAG
 GAACGGACGAGAGAA
 GGGAGAG-3'

vctB: 5' - CTCTCCCTTCTCGAA
 TCGTAACCGTTCTGTA
 CGAGAATCGCTGTCC
 TCTCCTT-3'

Vectorette unitを平滑末端に連結させたcDNAを鋳型として、下記表3に示すVectorette unitの片方鎖にハイブリダイズ

が有利である。高等動物テロメラーゼは、数種の蛋白質及びRNAサブユニットからなる複合体として存在する可能性があり、生理活性のある高等動物テロメラーゼとして組み換え体から精製する場合には、導入する高等動物テロメラーゼ蛋白質の由来する生物種と宿主細胞の由来する生物主の一致することが好ましい。もっとも、高等動物テロメラーゼ蛋白質を大腸菌で生産させた後、活性を有する複合体として *in vitro* で他の構成成分と再構成することが可能であることはいうまでもない。

動物細胞としては、例えばCHO細胞（生物種：ハムスター）、COS細胞（生物種：サル）、NIH3T3細胞（生物種：マウス）、Rat-1（生物種：ラット）細胞、VA-13（生物種：ヒト）細胞等が挙げられる。これらの細胞を宿主とした発現用プラスミドは、プロモーターとしてはSV40プロモーター由来またはウイルス遺伝子由来のプロモーターが好ましい。この下流に高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を5'側から挿入する。また高等動物テロメラーゼ蛋白質の生産量を上げるために、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を5'側から2～3個つなげたものを挿入してもよいし、各高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の5'側にSV40などのプロモーターを挿入したものを2～3個つなげてよい。この高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子の下流にポリアデニル化部位を含むことが好ましく、例えばSV40DNA、 β -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のものを用いることができる。

このような発現ベクターは、例えばCHO細胞などの動物細胞に形質転換した際の選択マーカーを有していてもよい。選択マーカーを用いる場合には、例えば、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子、ネオマイシン誘導体G-418耐性遺伝子などを用いることができる。各耐性遺伝子の5'側に例えばSV40由来のプロモーターが挿入されており、各耐性遺伝子の3'側にポリアデニル化部位が含まれていることが好ましい。高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現ベクターに対してこれらの耐性遺伝子を挿入する場合、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子のポリアデニル化部位下流に挿入すればよい。また、発現ベクターは形質転換体の選択マーカーを有していなくてもよい。この場合には、高等動物テロメラー

ゼ蛋白質の発現ベクターと共に形質転換体選択のマーカ―を有するベクター、例えば pSV2neo、pSV2gpt、pMTVdhfr などを用いて二重形質転換することが好ましい。

上記の高等動物テロメラーゼ蛋白質発現ベクター、またはそれに加えて形質転換体選択マーカ―を有するベクターにより形質転換した動物細胞を選択するためには、該選択マーカ―の発現による表現形質を利用することができる。さらに、高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現量の上昇を目的として、高等動物テロメラーゼ蛋白質の発現が確認された細胞に対し、選択マーカ―を変更して形質転換を繰り返してもよい。発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40 初期プロモーター、ウサギの β -グロビン遺伝子に由来するスプライス配列 DNA、ウサギの β -グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、SV40 初期領域からのポリアデニル化部位、並びに pBR322 由来の複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子を含有する pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78、1528、(1981)) などが挙げられる。

発現ベクターの動物細胞への移入はリン酸カルシウムや cationic lipid を DNA のキャリアとして用いるトランスフェクション法が一般的である。形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI 1640 などを用い、5～10% 血清存在下もしくは適当量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下で培養を行うか、又は無血清下で培養を行うことができる。高等動物テロメラーゼ蛋白質を発現している動物細胞中には高等動物テロメラーゼ蛋白質が大量に存在していると考えられるので、この形質転換体の培養物から得た蛋白抽出液を用いて高等動物テロメラーゼ蛋白質の分離精製を行うことが可能である。生産された高等動物テロメラーゼ蛋白質を含む培養上清は各種クロマトグラフィー、例えば、ヘパリンセファロースもしくはブルーセファロース等を用いたクロマトグラフィーにより精製可能である。

また大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主として用いるときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合 (SD) 配列、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝

子、転写終結配列、およびプロモーターを制御する遺伝子を含むことが好ましい。プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素 (*trp*)、ラクトースオペロン (*lac*)、 λ ファージ PL、PR、T5ファージの初期遺伝子のプロモーターである P25、P26 プロモーター等が挙げられる。また、これらは例えば *pac* プロモーター [Agric. Biol. Chem. 52、983-988、1988年] のように独自に改変、設計された配列でも良い。

リボゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでもよいが、DNA 合成により作成した 16S リボゾーム RNA の 3' 末端領域に相補的な配列を 4 塩基以上連続してもつコンセンサス配列を持ったものでもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、*trp* オペロンターミネーター等を有している方が好ましい。

発現に必要なこれらの因子の発現プラスミド上での配列順序は、例えば、5' 上流から、プロモーター、SD 配列、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子、転写終結因子の順であることが望ましい。また発現ベクター上の SD 配列と高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法（特開平 1-95798 号公報などに記載の方法）を用いることもできる。

発現した高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを大腸菌などの形質転換体からの簡便に回収、精製するために種々のアフィニティークラムを利用することができる。例えば、ヒスチジンが 6 個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジントグを有する蛋白質がキレートカラムに結合する性質を利用して、プロモーターの下流に例えばヒスチジンが 6 個以上並んだアミノ酸配列をコードする DNA を配置し、さらにその下流に高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を結合することにより、ヒスチジントグを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを発現させることができ、発現した高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドをキレートカラムにより容易に精製することができる。

さらに、ヒスチジntagと高等動物テロメラーゼ蛋白質を構成するポリペプチド又はその部分ポリペプチドとの間に、例えばトロンビン、TEVプロテアーゼ、又は第X因子などのプロテアーゼにより特異的に切断されるポリペプチド配列を組み込み、キレートカラム精製後のポリペプチドを対応のプロテアーゼで処理することにより、天然型の高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを回収することができる。プロテアーゼによる切断後はHPLC等により分離、精製することができる。

上記の他、発現ベクターとして使用できるものとして、pUAI2（特開平1-95798号公報）や市販のpKK233-2（Pharmacia社）等を挙げることができる。また、日本住血吸虫由来グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白として発現させる発現ベクターとしてpGEXシリーズ（Pharmacia社）を利用することができ、ヒスチジン配列を利用した精製が可能なベクターとしてpProEX-1（Gibco BRL）を用いることができる。宿主の形質転換法は、常法に従い行うことができる。また、昆虫細胞としては、例えばInvitrogen社のバキュロウイルス発現キットであるマックスバック（MAXBACTM、BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM MANUAL VERSION 1.4）のマニュアルに従い、このキットを使用することができる。この時、発現量上げるためにポリヘドリンのプロモーターから開始コドンまでの距離を変えることが好ましい。

形質転換体の培養は、当業者に利用可能な常法に従って行うことができる。培養温度としては、28℃～42℃が適当である。ラクトースオペロン（lac）のプロモーターを利用する場合は、菌体培養液の600nmの波長における吸光度がおよそ0.5になったところで、終濃度が1mM程度になるようにIPTGを加えて発現誘導を行うことが必要である。

上記方法で単離・精製された高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドを用いて、サル、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウスなどの哺乳類動物を免疫することができ、高等動物テロメラーゼ蛋白質を特異的に認識するポリクロー

ナルまたはモノクローナル抗体を作製することができる。その特異性の検討には、高等動物テロメラーゼ蛋白質遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体の培養液又は遺伝子産物の抽出液を用いることができる。

このような高等動物テロメラーゼ蛋白質又はその部分ポリペプチドに特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を固定化したアフィニティカラムを用いて、テロメラーゼ活性を有する不死化細胞株または形質転換体の抽出液から、高等動物テロメラーゼ複合体を濃縮・精製することができる。また、テロメラーゼ活性を有する真核動物不死化細胞株に対して、高等動物テロメラーゼ蛋白質とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ポリ・ヒスチジンなどのいわゆる「タグ配列」の融合蛋白質を発現するベクターを導入し、得られた形質転換体の抽出液をグルタチオン・セファロース (Pharmacia 社)、ニッケル・NTA・アガロース (Q I A G E N 社) 等の「タグ配列」に特異的に結合するリガンドを固定化したカラムに付して精製することにより、高等動物テロメラーゼ複合体を濃縮・精製することができる。以上のような方法で得られた高等動物テロメラーゼ複合体は、高活性の高等動物テロメラーゼとして阻害剤の評価などに利用することができるほか、新規な構成成分の解析、及びそれらの単離・精製の材料として用いることが可能である。

また、いわゆる「ツー・ハイブリッド (Two-hybrid) 法」に従い、酵母を含む様々な形質転換体を用いて、高等動物テロメラーゼ蛋白質に物理的に強固に結合する蛋白質をコードする遺伝子を単離・同定することができる。このような目的のためには、例えば Clontech 社の「Match Maker キット」などを用いることができる。

上記の高等動物テロメラーゼ蛋白質の特異抗体を用いることにより上記遺伝子の発現の程度を蛋白質レベルで観測することができ、核酸プローブや PCR プライマーを用いて遺伝子レベルでの発現状況を観測することができる。このような方法によれば、癌細胞の検出、並びにテロメラーゼ活性の変化に起因する疾患及びテロメラーゼ活性の変化を伴う疾患の診断が可能である。例えば、患者から分離・採取された試料を適宜の方法で抽出した後、特異抗体を用いた E L I S A 法

もしくはウェスタン・ブロット法、核酸プローブを用いたサザンまたはノザン・ブロット法、またはオリゴヌクレオチド・プライマーを用いたPCR法により判定を行うことができる。従って、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができる抗体又は本発明のヌクレオチド配列の一部又は全部に相補的に結合可能なヌクレオチド配列を含む核酸プローブは、癌細胞の検出試薬、又は癌診断用の医薬組成物の有効成分として有用である。

なお、後述の実施例で示したように、ラット由来のテロメラーゼ蛋白質には、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約240kDaの不活性型ポリペプチドと、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約230kDaの活性型ポリペプチドの存在が確認されている。また、約240kDaの不活性型ポリペプチドが最初に発現し、約230kDaの活性型ポリペプチドに変換される機構の存在が証明されている。従って、他の高等動物においても、同様な不活性型及び活性型のポリペプチドが存在しており、不活性型ポリペプチドから活性型ポリペプチドに変換される同様な機構が存在していることが当業者に自明である。これらの分子種（サブユニット）はいずれも本発明の範囲に包含される。

上記の活性型ポリペプチド及び不活性型ポリペプチドの存在比を測定することにより、テロメラーゼの活性化機構に作用する物質をスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、典型的には、被験物質を投与した後の高等動物の組織や細胞、又は培養系において被験物質の存在下で培養を行った高等動物の組織や細胞に含まれる上記の活性型ポリペプチド及び不活性型ポリペプチドの存在比を測定し、被験物質の非存在下での存在比と比較する工程を含んでいる。分子量の測定は、一般的には、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で行えばよい。

例えば、被験物質と接触していない細胞や組織に含まれるテロメラーゼ蛋白質のサブユニットの分子量をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で測定し、約240kDaのポリペプチドと約230kDaのポリペプチドとの存在比をあらかじめ調べておく。つぎに、被験物質を投与し、又は被験物質の存在下で培養を

行うことにより被験物質と接触させた細胞や組織に含まれるテロメラーゼ蛋白質のサブユニットの分子量を同様に測定し、約240kDaのポリペプチドと約230kDaのポリペプチドの存在比を測定する。被験物質と接触した細胞や組織において約240kDaのポリペプチドの存在比が非接触時の場合に比べて実質的に増加していれば、被験物質はテロメラーゼの活性化機構を阻害すると判定できる。一方、約230kDaの蛋白質の存在比が増加していれば、被験物質はテロメラーゼの活性化を促進すると判定できる。このようにしてテロメラーゼの活性化機構に作用することが確認された物質も本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例1：ラット・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の取得

(1) テトラヒメナ・テロメラーゼ・サブユニットp80遺伝子に相同な遺伝子の検索

Internetにて、National Center for Biotechnology Informationのhome pageにアクセスし、TBLASTNプログラムにて、テトラヒメナ・テロメラーゼ・サブユニットp80のアミノ酸配列に相同なアミノ酸配列をコードし得るDNA配列を検索した。その結果、Expression Sequence Tag (EST) DNA配列のデータベースに登録された、ラットPC12細胞由来の機能不明なmRNA配列に相補的なDNA配列(配列表の配列番号3)が、p80の一部のアミノ酸配列に弱い相同性(High Score: 94、Probability: 1.7×10^{-3})を示すアミノ酸配列(下記表1: ラットcDNA)をコードし得ることがわかった(表中、アミノ酸は1文字表記で示し、Xは終始コドンを表す)。

表 1

p 8 0 (N末端側) A V Y I R N E L

ラット c D N A (N末端側) X A S L Y A R Q Q L

p 8 0 Y I R T T T N Y I V A F C V V H

ラット c D N A N L R D I A N I V L A V A A L L

p 8 0 K N T Q P F I E K Y F N K A V L

ラット c D N A P A C R P H V R R Y Y S A I V H

p 8 0 L P N D L L E V C E F A Q V L Y

ラット c D N A L P S D W N Q V A E F Y Q V W Y

p 8 0 I (C末端側)

ラット c D N A L (C末端側)

(2) ラット・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の部分断片の取得

(1) で得られた p 8 0 のアミノ酸配列に極めて弱い相同性を示すラット由来のアミノ酸配列については、その上流に終止コドンが存在し、しかもその下流には開始コドンとしてのメチオニンが存在しないことから、このアミノ酸配列をコードする m R N A が実際に存在するものかどうか不明である。また、p 8 0 に相同性を有する蛋白質を生合成できるかどうか自体も不明である。しかし、データバンクに登録された D N A 配列に相補的な D N A 配列がこのアミノ酸配列をコードする可能性があり、実際転写された対応の m R N A はスプライシングを受けて、配列が変化している可能性がある。そこで、ラット由来細胞に実際にこの m R N A が存在するか否かを検討した。

まず、アデノウイルスで形質転換されたラット 3 Y 1 細胞由来 Z 1 9 細胞から、

Chomczynskiの方法(Anal. Biochem.、162、156-159、1987)によってRNAを調製した。すなわち、Z19細胞 10^8 個を、グアニジンイソチオシアネート溶液[4Mグアニジンイソチオシアネート(和光純薬)、25mMクエン酸ナトリウム(和光純薬)、0.1M 2-メルカプトエタノール、0.5%ザルコシン酸ナトリウム(和光純薬)]中でホモジナイズし、0.1容量の2M酢酸ナトリウム(pH4.0)を加えて混和した。このホモジュネートに等容量の水飽和フェノール(和光純薬)及び0.2容量のクロロホルム(和光純薬)/イソアミルアルコール(和光純薬)混合液(49対1、体積比)を加えて10秒間激しく混和し、10、000×g、20分間の遠心分離により上清の水層を回収した。回収した水層に等容量のイソプロパノール(和光純薬)を混和し、-20度で1時間冷却した後、15、000×g、20分間の遠心分離を行った。得られた沈澱物を再びグアニジンイソチオシアネート溶液に溶解し、等容量のイソプロパノールを加え、-20度で1時間冷却した後、15、000×g、20分間の遠心分離により総RNAを回収した。

RNAの精製は以下のように行った。すなわち、0.2mgの総RNAを1mMEDTA、20mMトリス塩酸(pH7.5)に溶解し、70℃、5分間の熱処理後、氷上で急冷した。この溶液に5M NaCl溶液を終濃度が0.5Mになるように加えて、Oligo-dTセルロースカラム(type 7, 1cm×1cm、Pharmacia社)に展開し、1mMEDTAおよび0.5M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)でカラムを洗浄後、滅菌脱塩水にて結合分画を溶出して4μgのpoly(A)⁺RNAを得た。

上記のようにして得られたpoly(A)⁺RNA 1マイクロgを鋳型にしてcDNAを合成し、このcDNAに10pmoleのランダム・ヘキサマー・プライマーと200ユニットのMMLV逆転写酵素(『SUPER SCRIPT』、GIBCO BRL)を加えて1st strandを合成し、次に、1.4ユニットのRNase H、40ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼI及び15ユニットの大腸菌DNAライゲースを加えて2nd strandを合成した。反応終了後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、上清の水層を回収した。回収

した水層と等容量の5M酢酸アンモニウム溶液を添加後、2倍容量のエタノールを混和した。次に、15、000×g、10分間の遠心分離を行い、エタノール沈澱によるcDNAの回収を行った。

上記のようにして得られたcDNAについて、Rileyらの方法(Vectorette法、Nucleic Acid Res.、18、2887-2890)を用いて、(1)の工程で得られたcDNA配列(配列番号3)に対応する部分のさらに5'側上流に位置する未知のcDNA配列を解析した。まず、60ngのcDNAをT4ポリメラーゼで処理して末端を平滑化し、さらに10ユニットの制限酵素PvuII(東洋紡製、緩衝液は添付のものを使用)と37℃で2時間インキュベートした。切断したDNAをフェノール/クロロホルム処理及びエタノール沈澱にて精製した後、下記表2に示すVectorette unit(vctAとvctBをアニールさせたもの)3pmoleをDNAリガーゼを用いて連結した。

表2

vctA: 5' - AAGGAGAGGACGCTG
 TCTGTCGAAGGTAAG
 GAACGGACGAGAGAA
 GGGAGAG - 3'

vctB: 5' - CTCTCCCTTCTCGAA
 TCGTAACCGTTCGTA
 CGAGAATCGCTGTCC
 TCTCCTT - 3'

Vectorette unitを平滑末端に連結させたcDNAを鋳型として、下記表3に示すVectorette unitの片方鎖にハイブリダイズ

する v c t G オリゴヌクレオチド・プライマーと、配列番号 3 に示す c D N A 配列にハイブリダイズする R a P C 5' オリゴヌクレオチド・プライマーとを用いた P C R を行い、R a P C 5' オリゴヌクレオチド・プライマーの結合する部分から 5' 側上流の未知の部分を含む c D N A を増幅した。増幅反応は常法に従い、P C R 用サーマルサイクラーを用いて 9 3 ° C で 1 分間、6 5 ° C で 1 分間、及び 7 2 ° C で 2 分間の保温サイクルを 3 5 回繰り返した。

表 3

v c t G : 5' - C G G T A C C G A A T C G T A
 A C C G T T C G T A C G A G A
 A T C G C T - 3'

R a P C 5' : 5' - C A T A C C T G G T
 A G A A C T C G G C T A - 3'

P C R 産物をフェノール/クロロホルム処理及びエタノール沈殿にて精製した後、一部を DNA リガーゼを用いて p T 7 B l u e T ベクター (P h a r m a c i a 社) に連結し、形質転換された組み換え大腸菌をアンピシリンで選択して、プラスミド DNA を調製した。挿入された P C R 産物の DNA 配列を A B I 3 7 3 A シークエンサー (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) を用いた S a n g e r 法により決定した。その結果、配列表の配列番号 4 に記載された塩基配列がプラスミド R a P C 5 3 に挿入された c D N A に見出された。

R a P C 5 3 の塩基配列を解析した結果、相補鎖 DNA から予想された配列表の配列番号 3 に記載の核酸番号 1 ~ 1 7 0 までの塩基配列が、実際のラット細胞では配列表の配列番号 4 の核酸番号 1 ~ 2 4 4 までの塩基配列に対応していることが認められた。配列表の配列番号 3 の核酸番号 1 6 3 ~ 1 7 2 までの塩基配列 (5' - T C T C T C C T A G - 3') が s p l i c i n g a c c e p t o r

s i t e のコンセンサス配列、5' - P y P y P y P y P y P y N C A G - 3' に相当することから、この結果はアーティファクトによるものではなく、スプライシングによるRNAの編集が行われた結果と考えられた。従って、配列表の配列番号3に記載の塩基番号170の〔T〕は実際には配列番号4の配列においては〔A〕となっており、終止コドンTAGがリジンAAGになっていた。しかも5' 側上流に向けてオープン・リーディング・フレームがさらに伸びていることが判明した。

また、そのオープン・リーディング・フレームのアミノ酸配列は、工程(1)で予想されたテトラヒメナp80のアミノ酸配列に相同性 (High Score : 94、Probability : 1.7×10^{-3}) を示すラット由来のアミノ酸配列に比べて、さらに高い相同性を示すものであり (High Score : 125、Probability : 1.6×10^{-18})、配列表の配列番号3の312番目の〔A〕が〔T〕となっており、対応するアミノ酸がアスパラギン (AAC) からイソロイシン (ATC) に変異していることが判明した。

(3) ラット・テロメラーゼ蛋白質全長cDNAの取得

まず、SV40ウイルスで形質転換されたラット3Y1由来SV-3Y1-C66細胞から、工程(1)の方法と同様な方法でpoly (A)⁺ RNAを得、STRATAGENE社のcDNA合成キットを用いてcDNAを調製した。cDNAの調製はマニュアルに従って行ったが、1st strand合成反応はプライマーとしてランダムヘキサマー・オリゴヌクレオチドとオリゴdTプライマーの両方を最終濃度各2 μM加えて行った。

次に、cDNAの末端にDNAリガーゼによってEcoRIアダプターを付加した後、反応産物をSepha cryl S-500カラムに展開し、未反応のEcoRIアダプターとサイズの小さいcDNAを除いた。素通り画分のcDNAをエタノール沈澱で回収し、予め制限酵素EcoRIで消化され、さらに末端を脱リン酸化されたλZAPファージDNAと上記のcDNAをDNAリガーゼで結合した。さらに、cDNAと結合したλZAPファージDNAをファージ粒子へパッケージングした。以上の作業はSTRATAGENE社のGIGAPACK

GOLD III キットを用い、添付のマニュアルに従って行った。得られたファージ粒子を常法に従い大腸菌 C 6 0 0 h f l A 株に感染させて増幅を行い、ファージ粒子を回収した。一連の操作により、約 5 0 0 万のファージクローンを得た。

約 1 0 0 万のファージクローンを常法に従い大腸菌 C 6 0 0 h f l A 株に感染させ、プレート上の N Z Y 寒天培地上で培養した。ナイロン膜にファージ粒子を写し取ったもののレプリカを 2 枚作製し、洗浄及びアルカリ処理した後、工程(2)で得られた R a P C 5 3 を ^{32}P 標識してプローブとして用い、このプローブにハイブリダイズするファージ・クローンをスクリーニングした。その結果、3つの陽性シグナルを見出したので、それらについてファージ粒子を回収し、同様な方法でクローン化した後、Stratagene社のマニュアルに従って挿入された cDNA 部分を含むプラスミド (R E T 1、R E T 2、R E T 3) を *in vivo excision* 法にて回収した。

プラスミド R E T 1、R E T 2、R E T 3 について制限酵素切断地図を作製したところ、各々 1. 3 k b p、2. 4 k b p、6. 5 k b p の cDNA が挿入されており、図 1 に示すように各々の cDNA が重複する位置にあることがわかった。常法に従って欠失変異 cDNA を作製し、R E T 1 の全長と R E T 2 及び R E T 3 の一部分の DNA 配列を解読した。それら DNA 配列を制限酵素切断地図に従って組み合わせたところ、約 4. 6 k b p にわたる大きなオープン・リーディング・フレームが見出された。この中には、工程 (2) で得られたテトラヒメナ p 8 0 のアミノ酸配列と相同性を示す R a P C 5 3 のアミノ酸配列 (High Score : 125、Probability : $1. 6 \times 10^{-18}$) も含まれており、ホモロジーサーチによりテトラヒメナ p 8 0 のアミノ酸配列とのさらに高い相同性が明らかになった (High Score : 234、Probability : $1. 1 \times 10^{-49}$)。

しかし、上記のオープン・リーディング・フレームの C 末端には終止コドンが見出されないこと、またいくつかのテロメラゼ活性陽性のラット細胞から抽出した mRNA のノザン解析の結果から、得られた cDNA の由来する実際の mRNA

は10 kb近い大きなものと考えられたことから、さらに3'側部分のcDNAの取得を試みた。すなわち、RET3の3'端に近い、配列表の配列番号1に示すDNA配列のうち核酸番号4083~5216にあたる部分のDNA断片を³²P標識してプローブとして用い、さらに約100万のファージクローンをスクリーニングした。その結果、新たに13の陽性シグナルが見出された。そのうち6個のクローンについてファージ粒子から挿入されたcDNA部分を含むプラスミド(RETλ01、07、08、09、10、13)を*in vivo excision*法にて回収した。

プラスミドRETλ01、RETλ09、RETλ13について制限酵素切断地図を作製したところ、各々5.0 kbp、4.9 kbp、4.9 kbpのcDNAが挿入されており、図1に示すように各々のcDNAが重複する位置にあることが判明した。これらのうち、RETλ13を新たに「RET7」と命名し、常法に従って欠失変異cDNAを作製して、RET7の全長のDNA配列を解読した。その結果と、プラスミドRET1、RET2及びRET3から得られたDNA配列の情報とを組み合わせたと、終止コドンを含めて7890 bpにわたる大きなオープン・リーディング・フレームが見出された(配列表の配列番号1)。

(4) ラット・テロメラーゼ蛋白質cDNAの取得—上流配列の取得(5'—RACE法)

工程(3)で得られたcDNAには、最も5'端のATGよりもさらに5'側に同フレームの終止コドンが見出せないため、さらに5'側のmRNAの配列について5'—Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)法を用いて検討した。

5'—RACE法は、Clontech社の5'—RACEキットを用い、マニュアルに従って行った。工程(3)においてSV-3Y1-C66細胞から得られたpoly(A)⁺ RNA 2 μgと、配列表の配列番号1の核酸番号1493~1515の部分に相補的なDNA配列のオリゴヌクレオチドプライマーNcEX3' 10 pmolとを混合し、加熱した後に急冷した。反応混合物に逆転写酵素(GIBCO BRL社のSuperScript)、基質ヌクレオチドと緩衝

液を加えて42℃で1時間反応させた。EDTAを加えて反応を停止させた後、アルカリ処理で鋳型RNAを分解し、イソプロパノール沈澱を行って単鎖cDNAを単離した。さらに、このcDNAの半量に、5'-RACE用アンカープライマー〔5'-P(+)ANC〕4 pmoleをRNAリガーゼを用いて連結させた。反応は、25%PEG存在下に37℃で3時間行った。

次に、NcEX3'で逆転写プライムされ、さらに3'端にアンカーDNA配列を付加された単鎖cDNAを鋳型として、アンカーDNAに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーRACE-PRMと、配列表の配列番号1の核酸番号1039~1056の部分に相補的なDNA配列のオリゴヌクレオチドプライマーRaPC5'を用いて、PCRによるDNA増幅を行った。反応には20分の1量の単鎖cDNAと各々10 pmoleのプライマーとを用い、GIBCO BRL社のTaqポリメラーゼを用いて添付のマニュアルに従ってPCRを行った。ただし、非特異的なDNA増幅を避けるために、反応はマニュアル・ホット・スタート法で開始した後、94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分のサイクルを35回繰返した。

PCR産物をpT7BlueTベクターに組み込み、増幅DNAの挿入されたものについてDNA配列を解読した結果、これらのうちの10クローンが殆ど同じDNA配列を有していた。これらのクローンのうち、代表的なクローンであるRACE3及びRACE5は図1に示すような位置に存在しており、配列表の配列番号1の核酸番号199~201のATGの5'側上流約200bpまでcDNAが逆転写及び伸長され得ることがわかった。配列表の配列番号1の塩基番号199~201のATGより5'側上流には、配列番号1のフレームと合う終止コドンは見出されなかったが、増幅されたDNAの長さがほぼ均一であることから、実際のmRNAの5'端に対応するcDNAを得た可能性が高いと考えられた。

実施例2：ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の取得

(1) ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の部分断片の取得

テトラヒメナp80のアミノ酸配列と実施例1の工程(3)で得られたラット・テロ

メラゼ蛋白質のアミノ酸配列との相同性を検討したところ、同一のアミノ酸配列がいくつか見出されたことから、そのような領域が種を越えて広く保存されている可能性が考えられた。そこで、そのような領域のアミノ酸配列から、いわゆる *degenerative* PCR プライマーを作製することにより、このプライマーを用いた PCR 法によってテトラヒメナやラット以外の各動物種固有のテロメラゼ蛋白質 cDNA 断片を取得できると期待された。

まず、センスプライマーとして、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 379～384 に対応する H P E T 5（配列表の配列番号 5）、アンチセンスプライマーとして、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 532～537 に対応する H P E T 3（配列表の配列番号 6）を用い、実施例 1 の工程(3) で得られたラット SV-3Y1-C66 細胞由来 cDNA 及び同様な方法で取得されたヒト卵巣奇形腫由来 PA-1 細胞由来 cDNA を鋳型として PCR を常法にて行ったが、PA-1 細胞由来 cDNA 及び陽性対照としての SV-3Y1-C66 細胞由来 cDNA から目的の DNA は増幅されなかった。

次に、センスプライマーとして、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 376～385 に対応する H P E T 5-2（配列表の配列番号 7）または配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 380～388 に対応する H P E T 5-3（配列表の配列番号 8）、アンチセンスプライマーとして配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 532～540 に対応する H P E T 3-2（配列表の配列番号 9）または配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 534～542 に対応する H P E T 3-3（配列表の配列番号 10）を用い、SV-3Y1-C66 細胞由来 cDNA 及び PA-1 細胞由来 cDNA の各々の鋳型について 4 通りのプライマーの組合せの PCR を常法にて行った。

PCR 産物をアガロース・ゲル電気泳動した後、臭化エチジウムで DNA を染色したゲルを UV イルミネーターで観察したところ、H P E T 5-2 または H P E T 5-3 と H P E T 3-2 との組み合わせで SV-3Y1-C66 細胞由来 cDNA を鋳型とした PCR を行った場合に、予想された約 500 bp の DNA 断片が増幅された。また、PA-1 細胞由来 cDNA を鋳型とした場合には、

H P E T 5 - 2 と H P E T 3 - 2 との組み合わせのプライマーを用いることによって同様に約 5 0 0 b p の D N A 断片が増幅された。この D N A 断片を p T 7 B l u e プラスミドにサブクローニングして D N A 配列を解読したところ、対応するラット c D N A 配列に塩基レベルで約 7 7 % の相同性を持ち、アミノ酸レベルでも 7 6 % の相同性を示す D N A 配列 (図 2、配列表の配列番号 2) が得られた。

そこで、得られた D N A 配列の情報を基にして、ヒト・テロメラーゼ蛋白質 c D N A 断片を P C R 増幅できるオリゴヌクレオチド・プライマーを設計した。センスプライマーとして、配列表の配列番号 2 の核酸番号 9 2 ~ 1 1 4 に対応する h T P C 5 (配列表の配列番号 1 1)、アンチセンスプライマーとして、配列表の配列番号 2 の核酸番号 4 3 3 ~ 4 5 5 に対応する h T P C 3 (配列表の配列番号 1 2) を用い、数種のヒト細胞 m R N A 由来 c D N A を鋳型として常法にて P C R を行った。

まず、ヒト胎盤由来総 R N A、ヒト B 細胞白血病由来 R a j i 細胞由来総 R N A、ヒト扁平上皮癌由来 A 4 3 1 細胞由来 p o l y (A) ⁺ R N A、ヒト乳癌由来 B T 4 7 4 細胞、S K B R 3 細胞、B S M Z 細胞、及び M C F 7 細胞由来 p o l y (A) ⁺ R N A を C h o m c z y n s k i の方法 (A n a l . B i o c h e m . 、 1 6 2、1 5 6 - 1 5 9、1 9 8 7) 及び P h a r m a c i a 社のキットを用いて取得し、P h a r m a c i a 社の F i r s t s t r a n d s y n t h e s i s k i t を用いて c D N A を合成した。

これら c D N A のおよそ 2 0 分の 1 量を鋳型として、h T P C 5 と h T P C 3 をプライマーとして用いた P C R を行った。D N A ポリメラーゼとしては、A m p l i t a q G o l d (P e r k i n - E l m e r 社) を用い、9 5 ° C で 1 0 分間の熱処理の後、9 5 ° C で 3 0 秒、6 5 ° C で 3 0 秒、及び 7 2 ° C で 3 0 秒の保温サイクルを 3 5 回繰り返した。その結果、予想された約 3 9 0 b p の D N A 断片がヒト癌細胞由来 c N A を鋳型としたときに増幅されてきたが、鋳型 (-) の陰性対照とヒト胎盤総 R N A 由来 c D N A を鋳型とした場合には検出されなかった。

この結果、hTPC5とhTPC3をプライマーとして用いればヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNA断片を増幅できることが判明したので、Clontech社製ヒト胸腺由来cDNAライブラリーのうち、10万個のファージを鋳型として用いて上記同様の方法でPCRを行ったところDNAの増幅は認められなかったが、100万個のファージを鋳型として用いたときに予想された大きさのDNAが増幅された。

そこで、上記cDNAライブラリーのベクターとして用いられているλgt10のcDNA挿入部位の5'側及び3'側に対応する2つのオリゴヌクレオチド・プライマー（各々、5'λgt10及び3'λgt10）（Clontech社製）とhTPC5とhTPC3をプライマーとして用い、hTPC5の5'側上流またはhTPC3の3'側下流の未知の部分のcDNA断片の取得を試みた。cDNAライブラリーのうち100万個のファージを鋳型とし、4通りのプライマーの組合せ（hTPC5対5'λgt10または3'λgt10及びhTPC3対5'λgt10または3'λgt10）のPCRを上記の方法に従って行った。ただしアニール温度は65℃の代わりに55℃にして行った。その結果、hTPC5の5'側上流約1.5kbpに対応する部分のDNA断片が増幅された。

(2) ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子全長cDNAの取得

まず、Raji細胞及びPA-1細胞それぞれ約1億個から、RNAzol溶液（Tel-Test社）を用いてChomczynskiの方法（Anal. Biochem.、162、156-159、1987）により総RNAを取得し、得られた総RNAをOligo-dTセルロースカラム（type 7、1cmx1cm、Pharmacia社）に付してそれぞれ約100μgのpoly(A)⁺RNAを得た。

cDNAの合成には、poly(A)⁺RNA 5μgを鋳型に用いた。反応にはcDNA synthesis module（Amersham社）に添付された逆転写酵素、リボヌクリアーゼH、大腸菌DNAポリメラーゼを用い、添付の説明書に従って二本鎖cDNAを合成した。次に、cDNA synthesis module（Amersham社）に添付されたT4 DNAポリメラーゼを

用いてcDNA末端の平滑化を行った。反応終了後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、上清の水層を回収した。回収した水層と等容量の5M酢酸アンモニウム溶液を添加後、2倍容量のエタノールを混和した。その後、15,000×g、10分間の遠心分離を行い、エタノール沈殿によりcDNAの回収を行った。回収したcDNAを乾燥して20μlの滅菌脱塩水に溶解した後、10μlのcDNA(約2μg)を分取して、その末端にEcoRIアダプター(宝酒造)を付加した。すなわち、20μlのT4DNAリガーゼ反応液「66mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)、6.6mM MgCl₂(和光純薬)、10mMジチオスレイトール(DTT、和光純薬)、66mMアデノシン5'-三リン酸(ATP、SIGMA社)」中で350単位のT4DNAリガーゼ(宝酒造)とともに16℃で2時間インキュベートし、200pmoleのEcoRIアダプターをcDNAの末端に結合した。

反応物を常法に従いSephacryl S-200カラム(1cm×4cm)に展開し、1mM EDTAと0.5mM NaClを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を用いて、末端にEcoRIアダプターを付加したcDNAを溶出した。溶出したcDNAをエタノール沈殿で回収し、沈殿を乾燥後、2μlの滅菌脱塩水に溶解した。あらかじめ制限酵素EcoRI(宝酒造)で消化後に末端を脱リン酸化したλZAPファージDNA(Stratagene社)1μgと、EcoRIアダプターを付加した上記のcDNA(400ng)とを、16℃のT4DNAリガーゼ反応液(5μl)中で18時間インキュベートして結合させた。さらに、cDNAと結合したλZAPファージDNAをGigapack II Gold(Stratagene社)を用いてファージ粒子へパッケージングした。

得られたファージ粒子を常法に従って大腸菌C600 hflA株に感染及び増幅させてファージ粒子を回収した。一連の操作により、100ngのcDNAあたり約200万のファージクロンを得た。約100万のファージクロンを常法に従って大腸菌C600 hflA株に感染させ、プレート上のNZY寒天培地上で培養した。ナイロン膜にファージ粒子を写し取ってレプリカを2枚作製し、

洗浄及びアルカリ処理した後、実施例2の工程(1)で得られたヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNA断片を³²P標識してプローブとして用い、このプローブにハイブリダイズするファージ・クローンをスクリーニングした。得られた陽性シグナルについてファージ粒子を回収し、同様な方法でクローン化した後、Stratagene社のマニュアルに従い、挿入されたcDNA部分を含むプラスミドを*in vivo excision*法にて回収した。

(3) 完全長ヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNA 3' 側下流配列の取得 (3' - RACE法)

上記工程(2)で得られたmRNAを鋳型にして、MarathonTM cDNA Amplification kit (Clontech社)を用いて、RACE法によるcDNAの増幅を行った。以下の反応において、合成DNAプライマーは、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付されたプライマー以外は、ABI 394 DNA合成機を用いて合成した。反応は、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付された緩衝液およびdNTPを用いて行った。

まず、cDNAの合成を行った。精製したpoly(A)⁺ RNA 1 μgとcDNA逆転写プライマー、5' - TTCTAGAATTCAGCGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (G/A/C) (G/A/C/T) - 3' (52ヌクレオチド)を逆転写酵素にて37℃で処理し、第1鎖cDNAを合成した。第2鎖伸長反応及び末端の平滑化を行い、cDNAの両端にアダプタープライマー、[5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT - 3' (44ヌクレオチド)と5' - PO₄ - ACCTGCCC - NH₂ - 3' (8ヌクレオチド)]を結合させた。最終反応の反応液10 μlを希釈して50 μlとし、以後の増幅反応に1 μlを用いた。

増幅反応は、ヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNAの配列の一部と相補的なプライマーおよび3'末端に付加したアダプタープライマーと相補的なプライマー[5' - CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC - 3' (27ヌク

レオチド)]、並びに Taq DNA ポリメラーゼを用いて行った。反応液の全量を $50 \mu\text{l}$ とし、 94°C で1分間のインキュベーションの後、 94°C で30秒間、 60°C で30秒間、及び 68°C で5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に 72°C で7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応液の10分の1量を5% PAGEにて解析した。また、上記反応液のうち $5 \mu\text{l}$ を50倍希釈し、その $5 \mu\text{l}$ を用いて2回目の増幅反応を行った。

2回目の増幅反応は1回目の増幅反応に準じて行った。希釈反応液 $5 \mu\text{l}$ を鋳型とし、ヒト・テロメラーゼ蛋白質 cDNA の配列の一部と相補的で1回目の増幅反応に用いたプライマーより内側に位置するプライマーおよび $5' - \text{ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC} - 3'$ (23ヌクレオチド) を用いて、Taq DNA ポリメラーゼでの増幅反応を行った。反応液の全量を $50 \mu\text{l}$ とし、 94°C で1分間のインキュベーションの後、 94°C で30秒間、 60°C で30秒間、及び 68°C で5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に 72°C で7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応終了後、反応液の10分の1量を5% PAGEにて解析した。

次に、ゲル断片から増幅した cDNA 断片を回収して精製し、T4 DNA リガーゼを用いてプラスミドベクター pCRII (Invitrogen 社) のクローニング部位に挿入して、得られた組み換えベクターで大腸菌 JM109 株を形質転換した。X-Gal-IPTG-LB-Amp 寒天培地上に出現した耐性菌で、かつ X-Gal により発色していない3つの形質転換体について、常法に従いプラスミドDNAを調製し、解析を行った。さらに、調製したプラスミドDNAを用いて cDNA の塩基配列を決定した。その結果、3' 非翻訳領域の塩基配列を有する cDNA 断片を得た。

(4) 完全長ヒト・テロメラーゼ蛋白質 cDNA 5' 側上流配列の取得 (5' - RACE 法)

5' - RACE 法の反応は、3' - RACE 法に準じて行った。合成 DNA プライマーは、MarathonTM cDNA Amplification kit に添付されたプライマー以外は ABI 394 DNA 合成機を用いて合成した。反

応は、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付された緩衝液およびdNTPを用いた。鋳型としては、3'-RACE法の反応と同様に、両端にアダプタープライマーを付加したcDNAを用いた。1回目の増幅反応は、ヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNAの配列の一部と相補的プライマーおよび3'末端に付加したアダプタープライマーと相補的な、3'-RACE法の反応の際にも用いたプライマー、5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (27ヌクレオチド)を用いた。反応液は全量を50 μ lとして、TaqDNAポリメラーゼを用いて増幅反応を行った。反応は、94℃で1分間のインキュベーションの後、94℃で30秒間、60℃で30秒間、及び68℃で5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に72℃で7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応後、反応液の10分の1量を5%PAGEにて解析した。また、上記反応液のうち5 μ lを50倍希釈し、その5 μ lを鋳型として用いて、2回目の増幅反応を行った。

2回目の増幅反応は1回目の増幅反応に準じて行った。プライマーとしては、ヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNAの配列の一部と相補的で1回目の増幅反応に用いたプライマーより内側に位置するプライマーおよび5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (23ヌクレオチド)を用いて行った。反応は、94℃で1分間のインキュベーションの後、94℃で30秒間、60℃で30秒間、及び68℃で5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に72℃で7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応後、反応液の10分の1量を5%PAGEで解析した。ゲル断片から増幅したcDNAを回収して精製し、プラスミドベクターpCRIIのクローニング部位に挿入した後、得られた組み換えベクターを用いて大腸菌JM109株を形質転換した。X-Gal-IPTG-LB-Amp寒天培地上に出現した耐性菌で、かつX-Galにより発色していない3つの形質転換体について、常法に従い、プラスミドDNAを調製した。調製したプラスミドDNAを用いて解析を行い、さらに、塩基配列の決定を行った。その結果、ヒト・テロメラーゼ蛋白質

の5' 非翻訳領域の配列を有するcDNA断片を得た。

実施例3：ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子の取得

(1) ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子全長cDNAの取得

ラット・テロメラーゼ蛋白質遺伝子を取得したのと同様、まず、PA-1細胞を用いてcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーを、前述のhTPC5（配列表の配列番号11）と前述のhTPC3（配列表の配列番号12）をプライマーとして用いたPCR産物をプローブにしてスクリーニングを行い、ヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子全長cDNAを取得した。

まず、PA-1細胞からpoly(A)⁺ RNAを得た。即ち、細胞10⁸個を、グアニジンイソチオシアネート溶液中でホモジナイズし、0.1容量の2M酢酸ナトリウム（pH4.0）を加えて混和した。このホモジュネートに等容量の水飽和フェノール及び0.2容量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加えて激しく混和し、遠心分離により上清の水層を回収した。回収した水層に等容量のイソプロパノールを混和し、-20度で1時間冷却した後、遠心分離を行った。得られた沈殿物を再びグアニジンイソチオシアネート溶液に溶解し、等容量のイソプロパノールを加え、-20度で1時間冷却した後、遠心分離により総RNAを回収した。

総RNAを1mM EDTA、20mMトリス塩酸（pH7.5）に溶解し、70℃、5分間の熱処理後、氷上で急冷した。この溶液にNaCl溶液を終濃度が0.5Mになるように加えて、Oligo-dTセルロースカラム（type7、1cm×1cm、Pharmacia社）に展開し、1mM EDTAおよび0.5M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）でカラムを洗浄後、滅菌脱塩水で結合分画を溶出してpoly(A)⁺ RNAを得た。

このpoly(A)⁺ RNAからStratagene社のcDNA合成キットを用いてcDNAを調製した。1st strand合成はプライマーとしてランダムヘキサマー・オリゴヌクレオチドとオリゴdTプライマーの両方を最終濃度各2μM加えて行った。T4DNAポリメラーゼを用いてcDNA末端の平滑

化を行った後、末端にEcoRIアダプターを付加した。反応産物をSephacryl S-500カラムに展開し、未反応のEcoRIアダプターとサイズの小さいcDNAを除いた。cDNAをエタノール沈殿で回収し、λZAPファージDNAに挿入した。

cDNAと結合したλZAPファージDNAを、Stratagene社のGIGAPACK GOLDIIIキットを用いて、ファージ粒子へパッケージングした。一連の操作により、約1000万のファージクローンを得た。

約100万のファージクローンを常法に従い大腸菌C600 hflA株に感染させ、プレート上のNZY寒天培地上で培養した。ナイロン膜にファージ粒子を写し取ったレプリカを2枚作製し、洗浄及びアルカリ処理した。hTPC5とhTPC3をプライマーとして用いたPCR産物を³²P標識してプローブとして用い、このプローブにハイブリダイズするファージ・クローンをスクリーニングした。その結果、2つの陽性シグナルを見出したので、それらについてファージ粒子を回収し、同様な方法でクローン化した後、挿入されたcDNA部分を含むプラスミド(pHB01、pHB04)をin vivo excision法にて回収した。

プラスミドpHB01、pHB04について制限酵素切断地図を作製したところ、各々1.1kbp、7.4kbpのcDNAが挿入されており、図4に示すような、重複する位置関係にあることがわかった。常法に従って欠失変異cDNAを作製し、pHB01、pHB04のDNA配列を解読した。このDNA配列を制限酵素切断地図に従って組み合わせたところ、約8.1kbpにわたる領域をカバーし、この中にC末端側のストップ・コドンを含む長大なオープン・リーディング・フレームが見出された。このオープン・リーディング・フレームから予測されるアミノ酸配列がラット・テロメラーゼ蛋白質のC末端側のアミノ酸配列と70%以上の同一性という高い相同性を示したことから、この配列がヒト・テロメラーゼ蛋白質のものであると判断した。

(2) ヒト・テロメラーゼ蛋白質cDNAの取得－上流配列の取得(5' - RACE法)

工程(1)で得られたDNA配列は配列表の配列番号13に示すDNA配列のうち核酸番号756番目以降の配列であったが、ラット・テロメラーゼ蛋白質との一次構造の比較から、オープン・リーディング・フレームがN末端側に向かって、さらに伸びていると考えられた。そこで、さらに5'側のmRNAの配列について5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)法を用いて検討した。

5'-RACE法は、Clontech社の5'-RACEキットを用い、マニュアルに従い行った。工程(1)においてPA-1細胞から得られたpoly(A)⁺RNA 2 μ gと、配列表の配列番号13の核酸番号1165'~1187番目の部分に相補的なDNA配列のオリゴヌクレオチドプライマーTLP CM3 10 pmolとを混合し、加熱した後に急冷した。反応混合物に逆転写酵素(GIBCO BRL社のSuperScript II)、基質ヌクレオチド、及び緩衝液を加えて42℃で1時間反応させた。EDTAを加えて反応を停止させた後、アルカリ処理で鋳型RNAを分解し、イソプロパノール沈殿を行って単鎖cDNAを単離した。さらに、このcDNAの半量に、5'-RACE用アンカープライマー[5'-P(+)ANC] 4 pmolをRNAリガーゼを用いて連結させた。

次に、TLP CM3で逆転写プライムされ、さらに3'端にアンカーDNA配列を付加された単鎖cDNAを鋳型として、アンカーDNAに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーRACE-PRM2と、配列表の配列番号13の核酸番号1024~1046の部分に相補的なDNA配列のオリゴヌクレオチドプライマーTLP NEとを用いて、PCRによるDNA増幅を行った。反応には20分の1量の単鎖cDNAと各々10 pmolのプライマーとを用い、GIBCO BRL社のTaqポリメラーゼを用いて添付のマニュアルに従ってPCRを行った。ただし、非特異的なDNA増幅を避けるために、反応はマニュアル・ホット・スタート法で開始した後、94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分のサイクルを35回繰り返した。

PCR産物をpT7 Blue Tベクターに組み込み、増幅DNAの挿入された

ものについてDNA配列を解読した結果、これらのうちの3クローンが殆ど同じDNA配列を有していた。これらのクローンのうち、代表的なクローンであるRACE-L4は図4に示す位置に存在するものであった。配列表の配列番号13の核酸番号156～158に開始コドンが存在し、さらに上流の同じく核酸番号144～146に同一フレームの終始コドンが存在した。開始コドンの5'側上流157bpまで、増幅されたDNAの長さがほぼ均一であることから、実際のmRNAの5'端に対応するcDNAを得た可能性が高いと考えられた。

実施例4：組換えラット・テロメラーゼ蛋白質の取得及び特異抗体の作製

日本住血吸虫グルタチオン-S-トランスフェラーゼとラット・テロメラーゼ蛋白質（配列表の配列番号1のアミノ酸番号217～345番目に相当する部分ポリペプチド）との融合蛋白質（GST-p80hom）を大腸菌を用いて発現させ、精製した遺伝子産物を抗原としてウサギを免疫した。次に、ラット・テロメラーゼ蛋白質の同じ部分を別の発現ベクターを用いてヒスチジン・ヘキサマーとの融合蛋白質（6His-p80hom）として発現させ、精製した遺伝子産物を用いてアフィニティ・カラムを作製し、ウサギ抗血清からラット・テロメラーゼ蛋白質を認識するポリクローナル抗体（配列表の配列番号1のアミノ酸番号217～345番目に相当する部分に特異的なポリクローナル抗体）を取得した。

まず、発現プラスミドベクターpGEX2T（Pharmacia社）を制限酵素SmaIで切断した後、HindIII切断部位を有するオリゴヌクレオチド・リンカーを挿入し、発現ベクターpGEXH12を作製した。このベクターを制限酵素EcoRIで切断した後、T4ポリメラーゼ（東洋紡）を用いて末端を平滑化し、さらに制限酵素HindIIIで切断した。次に、ラット・テロメラーゼ蛋白質cDNA断片含むプラスミドRaPC53を制限酵素BamHIで切断し、T4ポリメラーゼ（東洋紡）を用いて末端を平滑化した。その後、制限酵素HindIIIにてさらに切断して、ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動に付してラット・テロメラーゼ蛋白質cDNAの部分DNA断片（配列表の配列番号1の核酸番号648～1034に相当する約390bpのHindIII-

BamHI由来平滑末端のDNA断片)を単離した。以上により得られたHindIII-平滑末端のpGEXH12ベクターとラット・テロメラーゼ蛋白質cDNA由来DNA断片とをDNAライゲーション・キット(宝酒造)を用いて連結させ、得られた組み換えベクターを用いて大腸菌株JM109(東洋紡)を形質転換した。アンピシリン耐性のクローンについて各プラスミドの制限酵素切断地図を作成し、正しい組み換えプラスミドを保有しているpGEXp80hom/JM109を選択した。

pGEXp80hom/JM109を、アンピシリンを含む50mlのLB培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。翌日これを同じ培地で10倍希釈し、さらに37℃で1時間培養した後、IPTGを最終濃度0.3mMになるように加え、SDS-PAGEで分子量約44kDaのGST-p80homを発現させた。GST-p80homを発現させた組み換え大腸菌はFrangoniの方法(Anal. Biochem.、210、179、1993)に従って、最終濃度1.5%ザルコシル酸ナトリウムを含む緩衝液中で溶解し、最終濃度2%トライトンX-100を加えた後、グルタチオン・セファロース・ビーズ(Pharmacia社)を加えて懸濁した。4℃で40分懸濁しながら保温した後、ビーズを1%トライトンX-100を含むリン酸緩衝液(PBS)で洗浄してカラムに充填した。ビーズに結合したGST-p80homを25mM還元型グルタチオン及び0.1%トライトンX-100を含むHepes緩衝液で溶出した。

典型的には、100ml培養分の組み換え体から0.7mgのGST-p80homが得られた。GST-p80homをトロンビン処理することにより、融合蛋白質は、SDS-PAGEにおける見かけの分子量が約29kDaのGSTと約16kDaのラット・テロメラーゼ蛋白質断片(配列表の配列番号1に示すラット・テロメラーゼ蛋白質においてアミノ酸番号217~345に相当する部分)の2つに切断された。後者をPVDF膜に固定化处理してN末端のアミノ酸配列をエドマン法にて解析し、予想されたアミノ酸配列と同一であることを確認した。体重約2.6kgの日本在来種雄ウサギ2羽(R1及びR2)を常

法に従って1回につき100 μ gのGST-p80homとフロイント・アジュバントの混合物で免疫して抗血清を得た。

上記抗血清からラット・テロメラーゼ蛋白質特異的な抗体を精製するためのアフィニティ・カラムを作製するため、GSTの代わりにヒスチジン・ヘキサマーをタグ配列として用いて同じ部分の抗原を発現させ、同様に精製した。まず、プラスミドRaPC53を制限酵素HindIII及びBamHIで切断し、ラット・テロメラーゼ蛋白質cDNAの約390bpのHindIII-BamHIのDNA断片（配列表の配列番号1で核酸番号648～1034に相当する）を単離し、この断片をpBlueScript（東洋紡）のHindIII-BamHI部位にサブクローニングした。制限酵素XhoI及びNotIを用いて、このプラスミドからラット・テロメラーゼ蛋白質cDNAの核酸番号648～1034（配列表の配列番号1）に相当するDNA断片を含むXhoI-NotI DNA断片を単離し、制限酵素SalI及びNotIで切断した発現プラスミドベクターpProEX-1（Gibco BRL社）とDNAライゲーション・キット（宝酒造）を用いて連結させた。得られた組み換えベクターを用いて大腸菌株JM109（東洋紡）を形質転換した。アンピシリン耐性のクローンについて各プラスミドの制限酵素切断地図を作成し、正しい組み換えプラスミドを保有しているpProEXp80hom/JM109を選択した。

pProEXp80hom/JM109をアンピシリンを含む50mlのLB培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。翌日この培養物を同じ培地で10倍希釈し、さらに37℃で1時間培養した後、IPTGを最終濃度1mMになるように加えて、SDS-PAGEで分子量約18kDaの6His-p80homを発現させた。6His-p80homを発現させた組み換え大腸菌を、Qiagen社のプロトコルに従って6Mグアニジン塩酸を含む結合緩衝液に溶解し、Ni-NTA-アガロース（Qiagen社）で展開した。ビーズを洗浄した後、結合した6His-p80homを6M尿素を含むpH4.3のTris/リン酸緩衝液で溶出した。精製された6His-p80homを含む画分を中和した後、PBSに対して透析して尿素を希釈し、不溶性物質を遠心分離で除い

た。上清にアフィゲル10 (Biorad社) を懸濁させ、6His-p80homをクロスリンクしたアフィニティ・ビーズを作製した。典型的には、100ml分のpProEXp80hom/JM109の培養菌体から0.7mgの可溶性の6His-p80homが得られ、その95%以上がアフィゲル10にクロスリンクされた。

「Antibody」(Ed Harlowら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記載の方法に従って、GST-p80で免疫されたR1の7週間目の過免疫血清2mlから175 μ g (R1-41d)、R2の7週間目の過免疫血清2mlから86 μ g (R2-41d)の抗体を得た。これらの精製抗体がGSTに対しては反応せず、ラット・テロメラゼ蛋白質(配列表の配列番号1に示すラット・テロメラゼ蛋白質のうち、アミノ酸番号217~345に相当する部分)にのみ反応することを、ウェスタン・ブロット法で確認した。

実施例5：免疫沈降法及びテロメラゼ活性測定による、抗ラット・テロメラゼ蛋白質特異抗体の評価

実施例1から実施例3で得られたラットまたはヒト由来のテロメラゼ蛋白質cDNAが、実際にラットまたはヒト・テロメラゼ蛋白質をコードしていることを以下のように証明した。すなわち、実施例4で得られた組み換えラット・テロメラゼ蛋白質断片に対する特異抗体を用いて、ラットまたはヒト細胞抽出液中のテロメラゼ活性が免疫沈降されるかどうかを検討した。

まず、R1の免疫前血清からプロテインAセファロース(Pharmacia社)を用いて総IgGを精製し(P1-1)、このIgGとR1の過免疫血清から得られた精製IgG、R1-41d(免疫開始後7週後血清由来)及びR1-116d(免疫開始後16週後血清由来)の3種類のIgGを予めプロテインAセファロースにコートした。ヒト卵巣奇形腫由来PA-1細胞及びラット肝癌由来AH66F細胞から、Counterらの方法(EMBO J.、11、1921、1992)に従ってS100抽出液を調製した。この抽出液に等容量

の1%CHAPS/1×Hypo緩衝液(Counterら、上掲論文)を加えた混合物150 μ lに、5 μ gのIgGをコートした上記プロテインAセファロース・ビーズを加え、4℃で1.5時間保温した。その後、0.5%CHAPS/1×Hypo緩衝液で洗浄した各々のビーズをテロメラーゼ反応液に懸濁して、テロメラーゼ活性を測定した。

テロメラーゼの活性は、Tatematsuらの方法(Oncogene、13, 2265-2274, 1996)に従い、ジゴキシゲニン標識dUTPと抗ジゴキシゲニン抗体を用いたELISA法で測定した。ただし、テロメラーゼによる伸長反応の際のプライマーとして5'端をビオチン標識したオリゴヌクレオチド bpTG3 (Biotiny l a t e d 5' - GTAAACGACGGCCAGTTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTG - 3')を用い、各々0.8mMのモノデオキシヌクレオチド(TTP、dATP、dGTP)を基質として、30℃で1時間反応させた。酵素反応は過剰のEDTAを加えることにより停止させた。

一方、EDC(Sigma社製)を用いてストレプトアビジン(GIBCO BRL社製)をポリカーボネート製96穴マイクロタイタープレート(タカラ)にクロスリンクさせ、ブロッキング剤(ベーリンガー・マンハイム山之内社製)を用いて37℃で2時間ブロッキングした。上記の各ウェルに、TBSで希釈したテロメラーゼ伸長反応産物25 μ lを加えて、37℃で30分保温してプレート上のストレプトアビジンに結合させた。サンプル溶液を捨てた後、過剰量のビオチン溶液を加えて37℃で30分保温し、余剰のストレプトアビジンをブロッキングした。

各ウェルを洗浄した後、20mMTris-HCl(pH8.3)、75mMKCl、0.005%W-1、1.5mM MgCl₂、4 μ MのbpTG3、1 μ Mのオリゴヌクレオチドプライマー、pTAGガンマ(5' - CAGGAAACAGCTATGACCCCTAACCCTAACCCTAACCCT - 3')、各々50 μ MのdATP、dCTP、dGTP、25 μ MのTTP、1 μ Mのジゴキシゲニン-dUTP(ベーリンガー・マンハイム山之内社製)、及

びタック・スタート・アンチボディ（東洋紡社製）処理した1ユニットのタックポリメラーゼ（GIBCO BRL社製）を含むPCR反応液を加え、タカラ・PCRサーマルサイクラーを用いてPCR増幅を行った（93℃で30秒、69℃で30秒、72℃で1分の条件で34サイクル）。

50 mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）を用いて5 mg/mlに調製したストレプトアビジンを、白色ポリスチレン製96穴マイクロタイタープレートに100 μ l/ウェルの割合で分注後、37℃で1時間保温してストレプトアビジンをコートした。ストレプトアビジン溶液を捨てた後、ブロッキング剤を150 μ l/ウェルの割合で分注し、37℃で2時間ブロッキングした。このウェルに、TBSで20倍に希釈したPCR産物を100 μ l/ウェルずつ加え、37℃で30分保温してプレートに結合させた。さらに、各ウェルを150 μ l/ウェルの0.05% Tween 20/TBSで5回洗浄した後、TBSで5000倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（ベーリンガー・マンハイム山之内）を加えて37℃で30分保温した。プレートを150 μ l/ウェルの0.05% Tween 20/TBSで5回洗浄した後、0.1 Mジエタノールアミン緩衝液（pH 9.5）で100倍希釈したCSPD（Disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo(3.3.1.1^{3,7})decan]-4-yl)phenyl phosphate）（Tropix社製）を加え、室温で30分間化学発光させてルミノメーター（ベルトールド・ジャパン）で発光量を定量した。

この結果、ラット癌細胞抽出液またはヒト癌細胞抽出液のいずれを用いた実験においても、図3に示すようにIgGをコートしていないビーズ、免疫前血清由来IgG（PI-1）をコートしたビーズにはテロメラーゼ活性が殆ど認められなかったが、実施例4で得られた組み換えラット・テロメラーゼ蛋白質断片に対する特異抗体の2ロットのいずれかをコートしたビーズには明らかに高いテロメラーゼ活性が認められた。

実施例6：³⁵S-メチオニン標識ラット癌細胞抽出液の免疫沈降による、抗ラット・テロメラーゼ蛋白質特異抗体の評価

500万個のラット肝癌由来AH66F細胞を、透析済みウシ胎児血清(dFCS)10%を含むメチオニン欠乏ダルベッコ変法MEM(DMEM)で洗浄した後、³⁵S-メチオニンを加えた同培地中で培養して³⁵S標識し、実施例5で用いた0.5%CHAPS/1×Hyp緩衝液中で抽出した。ウサギR1の免疫前血清由来IgG、または組み換えラット・テロメラーゼ蛋白質断片による過免疫血清由来IgGを予めコートしたプロテインAセファロース・ビーズを同細胞数に相当する抽出液に加えて4℃で2時間保温した。洗浄後、LaemmliのSDS変性緩衝液を加えて加熱・変性し、6%SDS-PAGEで展開した。ゲルを酢酸で固定した後、ENHANCE(NEN社製)処理し、乾燥後にフルオログラフィーに付した。その結果、過免疫血清由来IgG処理したサンプルにのみ、約300kDaの明確なバンドが観察された。

実施例7：ヒト・テロメラーゼ蛋白質mRNAのヒト癌細胞及び正常組織における発現

Clontech社のMultiple Tissue Northern Blot及び、Human Cancer Cell Line Multiple Tissue Northern Blotを用いて、ヒト・テロメラーゼ蛋白質mRNAのヒト癌細胞及び正常組織における発現を検討した。プローブとしては実施例2の工程(1)で得られたヒト・テロメラーゼ蛋白質遺伝子cDNA断片(配列表の配列番号2)を³²P標識して用い、ハイブリダイゼーションは50%フォルムアミド存在下に42℃で一昼夜行った。各プロット膜を0.1%SDSを含む1×及び0.1×SSPE緩衝液で洗浄した後に、オートラジオグラフィーに付した。

その結果、脾、胸腺、脾、精巣、卵巣、小腸、大腸、心臓、胎盤、肺、肝、骨格筋、及び腎などのヒト正常組織由来のpoly(A)⁺RNAには明確な10.7kbのバンドが検出された。また、ヒト癌由来細胞株由来のpoly(A)⁺

RNAのプロットでは、10.7 kbのバンドに加えて、8.6 kbの短い分子種が観察された。

実施例8：ラット・テロメラーゼ蛋白質の精製と分子種の同定

3×10^9 個のラット肝癌由来細胞株AH66F細胞からCounterらの方法(EMBO. J、11、1921、1995)に従ってS100抽出液を調製した。これを、TMG緩衝液(10 mM Tris-酢酸 pH 8.0、1 mM

塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトール、10%グリセロール)で飽和したヘパリンセファロースCL-6Bカラム(ファルマシア社)に供し、塩化カリウムを用いた段階溶出を行った。各溶出画分中のテロメラーゼ活性を実施例5で用いた方法で測定し、活性を含む画分を集めた。これを50 mM 塩化カリウムを含むTMG緩衝液で飽和したハイドロキシアパタイトカラム(バイオラッド社)に供し、5 mM KP緩衝液(0.25 mM リン酸二水素一カリウム、4.75 mM リン酸一水素二カリウム、50 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトール、10%グリセロール)で洗浄後、0.5 M KP緩衝液(25 mM リン酸二水素一カリウム、47.5 mM リン酸一水素二カリウム、50 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトール、10%グリセロール)を用いた段階溶出を行った。

テロメラーゼ活性を有する画分を集め、50 mM 塩化カリウムを含むTMG緩衝液(ジチオスレイトール不含)で飽和した陰イオン交換カラム(商品名リソースQ、ファルマシア社)に供し、塩化カリウムを用いた段階溶出を行った。次いで、テロメラーゼ活性を有する画分を集め、0.5 M 塩化カリウムと1 mM イミダゾールを含むTMG緩衝液(ジチオスレイトール不含)で飽和した金属(Zn^{2+})キレートアフィニティカラム(商品名ハイトラップ キレーティング、ファルマシア社)に供し、イミダゾールを用いた段階溶出を行った。テロメラーゼ活性を有する溶出画分を15-40%グリセロール濃度勾配遠心分離(ベックマン社SW28ローター、25000回転、2℃、24時間)に供した。その結果、テロメラーゼ活性と相関のある蛋白質として44Sの沈降係数を示すものが

得られ、その分子量は約1500kDaと計算された。

さらに、グリセロール濃度勾配遠心分離で生じた各画分を6%SDS-PAGEで分離し、実施例4で取得した組換えラット・テロメラーゼ蛋白質に対する特異抗体でウェスタンブロットを行ったところ、テロメラーゼ活性を示す蛋白質画分には3つの抗体反応性のバンド（SDS-PAGE上の分子量は約240kDa、230kDa、55kDa）が観察された。このうち55kDaのバンドは熱処理実験により240kDaまたは230kDaの蛋白質の分解産物であることを確認した。この結果より、ラット・テロメラーゼ蛋白質には240kDaの蛋白質（以下「p240」と称することもある）を成分として構成されたものと、230kDaの蛋白質（以下「p230」と称することもある）を成分として構成されたもの二種類が存在すると推測された。

実施例9：ラットテロメラーゼ分子種の生成と活性化

p240とp230の生成過程を調べるため、細胞のパルス・チェイス実験を行った。10cmプラスチックディッシュに蒔いたラット肝癌由来細胞株AH66F細胞を250 μ Ci/mlの $[^{35}\text{S}]$ メチオニン（商品名Trans 35S-label、ICN社）と10%牛胎児血清（JRH バイオサイエンス社）を含む1mlのDMEM培地（メチオニン、システイン不含、ライフテックオリエンタル社）中で30分間パルスラベルし、次いで大過剰の非放射性メチオニンを培地中に添加した。非放射性メチオニン添加後0、1、3、6時間後に細胞を回収し、組換えラット・テロメラーゼ蛋白質に対する特異抗体を用い、実施例4と同様に免疫沈降を行った。

得られた免疫沈降物を6%SDS-PAGE、次いでオートラジオグラフィーに供した。その結果、パルスラベル直後（0時間）では免疫沈降されたのは主にp240であった。しかし、経時的（1、3、6時間）にp240は減少し、p230が増加した。このことから、ラット・テロメラーゼ蛋白質は、はじめp240を含む構成の蛋白質として発現され、その後修飾を受けてp230を含む構成の蛋白質になると考えられる。

ラット正常組織及びラット肝癌由来細胞株AH66F細胞中のp240/p230の存在比と、テロメラーゼ活性との相関を調べた。まず、ラット肝臓、腎臓、精巣及びAH66F細胞からCounterらの方法(EMBO. J、11、1921、1995)に従ってS100抽出液を調製し、これを実施例8と同様にヘパリンセファロースCL-6Bカラムにて部分精製した。各テロメラーゼ部分精製画分について組換えラット・テロメラーゼ蛋白質特異抗体を用いたウェスタンブロット法によるp230/p240存在比、および、テロメラーゼ活性の測定を行った。その結果、テロメラーゼ活性の強さの順は高いものよりAH66F細胞、精巣、肝臓であり、腎臓では検出されなかった。一方、p230の存在比は多い順にAH66F細胞、精巣、肝臓であった。腎臓ではほとんどp230は観察されなかった。

この結果はp230の存在比とテロメラーゼ活性との強い相関を示しており、p230が活性型、p240は不活性型のラット・テロメラーゼ蛋白質を構成する分子種であると考えられる。以上より、ラットテロメラーゼは、はじめ不活性型のp240で構成された分子種として生成され、その後修飾を受けてp240がp230に変化し活性型分子種が生成することが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、細胞増殖に必須であり、かつ癌細胞の増殖への関与が示唆されている高等動物由来のテロメラーゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子が提供された。本発明のテロメラーゼ蛋白質及びそれをコードする遺伝子は、例えば、細胞増殖及び細胞の老化などの生体制御機構の解明に有用であり、癌の治療薬の開発に特に有用性が期待される。また、本発明のテロメラーゼ蛋白質を特異的に認識する抗体は癌細胞の検出のための試薬として有用であり、癌の早期発見を目的とした臨床検査薬としての有用性が期待される。さらに、本発明のテロメラーゼ蛋白質のサブユニットが活性型および不活性型ではSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法における分子量が異なるという性質を利用して、テロメラーゼ蛋白質に作用する薬物のスクリーニングを行うことが可能になる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 核酸 = 8215、アミノ酸 = 2629

配列の型 : 核酸及びアミノ酸

トポロジー : 直鎖状二本鎖

配列の種類 : cDNA

起源 : 生物名 ラット

配列

```

AGCTCCGCCC CTCCCCTTGC CCAGCCTCGC CCCTTCGCCT CTCTAGGGTG TTGGTTTCCT   60
TTCAGTTCTC TTTCTTCAAC CTATCCACTG GCTGACCTAG GCCGGTTTCT GCTCCTTGTT  120
GCGGAGAACC AACGCGCCCC TCACTGTGCA CAGCTTTTCC AGTCCCGAGC GCAGGCACAT  180
AGAGATTGTG CTGCCGCT ATG GAG AAA CTC TGT GGT TAT GTG CCT GTC          228
      Met Glu Lys Leu Cys Gly Tyr Val Pro Val
              1              5              10
CAC CCA GAC ATC CTC TCC TTG AAG AAT CGG TGC CTG ACC ATG CTC TCT   276
His Pro Asp Ile Leu Ser Leu Lys Asn Arg Cys Leu Thr Met Leu Ser
              15              20              25
GAC ATC CAA CCC CTG GAG AAA ATA CAT GGA CAG AGA TCT GTC AAC CCA   324
Asp Ile Gln Pro Leu Glu Lys Ile His Gly Gln Arg Ser Val Asn Pro
              30              35              40
GAC ATC CTG TCC TTG GAG AAC CGG TGC CTG ACC TTG CTC CCT GAT CTC   372
Asp Ile Leu Ser Leu Glu Asn Arg Cys Leu Thr Leu Leu Pro Asp Leu
              45              50              55
CAG CCC ATG GAG AAA ATA CAT GGA CAG AGA TCT GTC CAC CCA GAC ATC   420
Gln Pro Met Glu Lys Ile His Gly Gln Arg Ser Val His Pro Asp Ile
              60              65              70
CTC TCC TCA GAG AAC CGG TGT CTG ACC TTG CTC CCT GAC CTC CAG TCC   468

```

Leu Ser Ser Glu Asn Arg Cys Leu Thr Leu Leu Pro Asp Leu Gln Ser
 75 80 85 90
 CTG GAG AAG CTA TGT GGA CAT ATG TCT AGT CAC CCA GAC GTC CTC TCT 516
 Leu Glu Lys Leu Cys Gly His Met Ser Ser His Pro Asp Val Leu Ser
 95 100 105
 TTG GAG AAC CGA TGT CTT GCT ACC CTC CCG ACT GTA AAG AGA ACT GTT 564
 Leu Glu Asn Arg Cys Leu Ala Thr Leu Pro Thr Val Lys Arg Thr Val
 110 115 120
 TCG AGT GGC CCC TTG CTC CAG TGT CTT CAC AGA TCT CAT ACG GCA CAA 612
 Ser Ser Gly Pro Leu Leu Gln Cys Leu His Arg Ser His Thr Ala Gln
 125 130 135
 GCT GAT CTG CGT GAC CCG AAC TTT CGC AAC TGC CTG TTC CCT GAG CCT 660
 Ala Asp Leu Arg Asp Pro Asn Phe Arg Asn Cys Leu Phe Pro Glu Pro
 140 145 150
 CCT ACC ATA GAG GCT CCA TGT TTC TTG AAG GAA CTA GAC CTT CCA ACT 708
 Pro Thr Ile Glu Ala Pro Cys Phe Leu Lys Glu Leu Asp Leu Pro Thr
 155 160 165 170
 GGA CCC AGG GCC CTG AAA TCC ATG TCT GCT ACA GCT CGA GTT CAG GAA 756
 Gly Pro Arg Ala Leu Lys Ser Met Ser Ala Thr Ala Arg Val Gln Glu
 175 180 185
 GTA GCT TTG GGT CAG CGG TGC GTC TCA GAA GGA AAG GAA TTG CAG GAA 804
 Val Ala Leu Gly Gln Arg Cys Val Ser Glu Gly Lys Glu Leu Gln Glu
 190 195 200
 GAA AAA GAA AGC GCA GAA GTC CCG ATG CCT TTG TAC AGT CTA AGC TTG 852
 Glu Lys Glu Ser Ala Glu Val Pro Met Pro Leu Tyr Ser Leu Ser Leu
 201 210 215
 GGG GGA GAA GAA GAA GAA GTG GTG GGG GCA CCG GTC CTA AAA CTC ACA 900
 Gly Gly Glu Glu Glu Glu Val Val Gly Ala Pro Val Leu Lys Leu Thr

220	225	230	
TCT GGA GAC TCT GAC TCT CAC CCT GAA ACC ACT GAC CAG ATC CTG CAG	948		
Ser Gly Asp Ser Asp Ser His Pro Glu Thr Thr Asp Gln Ile Leu Gln			
235	240	245	250
GAG AAG AAG ATG GCT CTC TTG ACC TTG CTG TGC TCA GCT ATG GCC TCA	996		
Glu Lys Lys Met Ala Leu Leu Thr Leu Leu Cys Ser Ala Met Ala Ser			
255	260	265	
AGT GTG AAT GTG AAA GAT GCC TCC GAT CCT ACC CGG GCA TCT ATC CAT	1044		
Ser Val Asn Val Lys Asp Ala Ser Asp Pro Thr Arg Ala Ser Ile His			
270	275	280	
GAA GTC TGC AGT GCG CTG GCC CCC TTG GAA CCT GAG TTC ATC CTT AAG	1092		
Glu Val Cys Ser Ala Leu Ala Pro Leu Glu Pro Glu Phe Ile Leu Lys			
285	290	295	
GCA TCT TTG TAT GCT AGG CAG CAG CTT AAC CTC CGG GAC ATA GCC AAT	1140		
Ala Ser Leu Tyr Ala Arg Gln Gln Leu Asn Leu Arg Asp Ile Ala Asn			
300	305	310	
ATA GTG TTG GCC GTG GCT GCC CTC TTG CCA GCC TGC CGC CCC CAT GTA	1188		
Ile Val Leu Ala Val Ala Ala Leu Leu Pro Ala Cys Arg Pro His Val			
315	320	325	330
CGA CGG TAT TAC TCT GCC ATT GTT CAC CTG CCT TCA GAC TGG ATC CAG	1236		
Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Ile Val His Leu Pro Ser Asp Trp Ile Gln			
335	340	345	
GTA GCC GAG TTC TAC CAG AGC CTG GCA GAA GGG GAT GAG AAG AAG TTG	1284		
Val Ala Glu Phe Tyr Gln Ser Leu Ala Glu Gly Asp Glu Lys Lys Leu			
350	355	360	
GTG CCC CTG CCT GCC TGC CTC CGT GCT GCC ATG ACT GAC AAA TTT GCC	1332		
Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Arg Ala Ala Met Thr Asp Lys Phe Ala			
365	370	375	

CAG TTT GAT GAG TAC CAG CTA GCG AAG TAC AAC CCA CGG AAA CAC CGA 1380
 Gln Phe Asp Glu Tyr Gln Leu Ala Lys Tyr Asn Pro Arg Lys His Arg
 380 385 390
 TCC AAG ACA CGT TCC CGC CAG CCA CCC CGC CCT CAA AGG ACA AAA CCT 1428
 Ser Lys Thr Arg Ser Arg Gln Pro Pro Arg Pro Gln Arg Thr Lys Pro
 395 400 405 410
 CCA TTT TCA GAG AGT GGG AAA TGT TTT CCA AAG AGC GTT TGG CCC CTT 1476
 Pro Phe Ser Glu Ser Gly Lys Cys Phe Pro Lys Ser Val Trp Pro Leu
 415 420 425
 AAA AAC GAA CAG ATT TCG TTC GAA GCA GCT TAT AAT GCA GTG TCA GAG 1524
 Lys Asn Glu Gln Ile Ser Phe Glu Ala Ala Tyr Asn Ala Val Ser Glu
 430 435 440
 AAG AAA AGG CTA CCA AGG TTC ACT CTG AAG AAG TTG GTA GAG CAA CTG 1572
 Lys Lys Arg Leu Pro Arg Phe Thr Leu Lys Lys Leu Val Glu Gln Leu
 445 450 455
 CAT ATC CAT GAG CCT GCG CAG CAT GTC CAG GCC CTG CTG GGC TAC AGG 1620
 His Ile His Glu Pro Ala Gln His Val Gln Ala Leu Leu Gly Tyr Arg
 460 465 470
 TAC CCA TCC ACC CTA GAG CTC TTT TCT CGG AGT CAT CTC CCT GGG CCA 1668
 Tyr Pro Ser Thr Leu Glu Leu Phe Ser Arg Ser His Leu Pro Gly Pro
 475 480 485 490
 TGG GAC TCT AGC AGG GCT GGG CAA CGG ATG AAG CTC CAA AGG CCA GAG 1716
 Trp Asp Ser Ser Arg Ala Gly Gln Arg Met Lys Leu Gln Arg Pro Glu
 495 500 505
 ACC TGG GAG CGG GAG CTG AGC TTA CGT GGA AAC AGA GCT TCT GTG TGG 1764
 Thr Trp Glu Arg Glu Leu Ser Leu Arg Gly Asn Arg Ala Ser Val Trp
 510 515 520
 GAG GAA CTC ATA GAC AAT GGG AAA CTC CCC TTC ATG GCC ATG CTC CGG 1812

Glu Glu Leu Ile Asp Asn Gly Lys Leu Pro Phe Met Ala Met Leu Arg
 525 530 535
 AAC CTG TGT AAC CTG CTG CGG ACT GGG ATC AGT GCC CAC CAC CAT GAA 1860
 Asn Leu Cys Asn Leu Leu Arg Thr Gly Ile Ser Ala His His His Glu
 540 545 550
 CTC GTT CTC CAG AGA CTC CAG CAT GAG AAA TCT GTG ATT CAC AGT CGG 1908
 Leu Val Leu Gln Arg Leu Gln His Glu Lys Ser Val Ile His Ser Arg
 555 560 565 570
 CAG TTT CCA TTC AGA TTC CTT AAT GCT CAC GAC TCT CTC GAT AGA CTC 1956
 Gln Phe Pro Phe Arg Phe Leu Asn Ala His Asp Ser Leu Asp Arg Leu
 575 580 585
 GAG GCT CAG CTC AGA AGT AAA GCA TCG CCC TTC CCT TCC AAT ACA ACA 2004
 Glu Ala Gln Leu Arg Ser Lys Ala Ser Pro Phe Pro Ser Asn Thr Thr
 590 595 600
 TTG ATG AAG CGG ATA ATG ATT AGA AAC TCA AAA AAA ATC AAG AGA CCT 2052
 Leu Met Lys Arg Ile Met Ile Arg Asn Ser Lys Lys Ile Lys Arg Pro
 605 610 615
 GCC AAC CCG AGG TAC CTG TGC ACC CTG ACG CAG CGG CAG CTT CGG GCG 2100
 Ala Asn Pro Arg Tyr Leu Cys Thr Leu Thr Gln Arg Gln Leu Arg Ala
 620 625 630
 GCA ATG GCT ATC CCG GTG ATG TAT GAG CAT CTC AAG CGG GAG AAA CTG 2148
 Ala Met Ala Ile Pro Val Met Tyr Glu His Leu Lys Arg Glu Lys Leu
 635 640 645 650
 AGG CTG CAC AAG GCC AGA CAG TGG ACC TGT GAC CTT GAG TTG CTG GAG 2196
 Arg Leu His Lys Ala Arg Gln Trp Thr Cys Asp Leu Glu Leu Leu Glu
 655 660 665
 CGG TAT CGC CAG GCC CTG GAA ACG GCC GTG AAC ATC TCT GTA AAG CAC 2244
 Arg Tyr Arg Gln Ala Leu Glu Thr Ala Val Asn Ile Ser Val Lys His

670	675	680	
AAC CTA CCC CCG CTG CCA GGC CGA ACC CTC TTG GTC TAT CTC ACA GAT	2292		
Asn Leu Pro Pro Leu Pro Gly Arg Thr Leu Leu Val Tyr Leu Thr Asp			
685	690	695	
GCA AAT GCC AAC AGA CTT TGT CCC AAG AGT CAC TTG CAA GGG CCT CCC	2340		
Ala Asn Ala Asn Arg Leu Cys Pro Lys Ser His Leu Gln Gly Pro Pro			
700	705	710	
CTG AAC TAT GTG CTG CTG TTG ATC GGG ATG ATG ATG GCT CGG GCG GAG	2388		
Leu Asn Tyr Val Leu Leu Leu Ile Gly Met Met Met Ala Arg Ala Glu			
715	720	725	730
CAG ACG ACA GTT TGG CTG TGT GGG ACA GGA ACT GTG AAG ACA CCA GTA	2436		
Gln Thr Thr Val Trp Leu Cys Gly Thr Gly Thr Val Lys Thr Pro Val			
735	740	745	
CTT ACA GCC GAC GAA GGT ATC CTG AAG ACT GCC ATC AAA CTT CAG GCT	2484		
Leu Thr Ala Asp Glu Gly Ile Leu Lys Thr Ala Ile Lys Leu Gln Ala			
750	755	760	
CAA GTC CAG GAG TTA GAA GAA AAT GAT GAG TGG CCC CTG GAA ACT TTT	2532		
Gln Val Gln Glu Leu Glu Glu Asn Asp Glu Trp Pro Leu Glu Thr Phe			
765	770	775	
GAG AAG TAC CTG CTA TCT CTG GCT GTG CGA AGG ACC CCT ATT GAC AGG	2580		
Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Ala Val Arg Arg Thr Pro Ile Asp Arg			
780	785	790	
GTC ATC CTG TTC GGC CAA AGG ATG GAT ACG GAG CTG CTG AAT GTA GCC	2628		
Val Ile Leu Phe Gly Gln Arg Met Asp Thr Glu Leu Leu Asn Val Ala			
795	800	805	810
AAA CAG ATT ATC TGG CAG CAT GTG AAT TCC AAG TGC CTC TTC GTC AGT	2676		
Lys Gln Ile Ile Trp Gln His Val Asn Ser Lys Cys Leu Phe Val Ser			
815	820	825	

GTC CTC CTA CGG AAA ATG CAG TAC ATG TCA CCA AAT TTG AAT CCC AAT 2724
 Val Leu Leu Arg Lys Met Gln Tyr Met Ser Pro Asn Leu Asn Pro Asn
 830 835 840
 GAT GTG ACG CTC TCG GGC TGC ACT GAC GGG ATC CTG AAG TTC ATT GCG 2772
 Asp Val Thr Leu Ser Gly Cys Thr Asp Gly Ile Leu Lys Phe Ile Ala
 845 850 855
 GAG CAT GGA GCC TCT CGT CTT CTG GAA CAT GTG GGC CAA CTA GAT AAG 2820
 Glu His Gly Ala Ser Arg Leu Leu Glu His Val Gly Gln Leu Asp Lys
 860 865 870
 ATA TTC AAG ATC CCT CCA CCC CCA GGA AAG ACA AAG GTC TCA CCT CTC 2868
 Ile Phe Lys Ile Pro Pro Pro Pro Gly Lys Thr Lys Val Ser Pro Leu
 875 880 885 890
 CGG CCG CTG GAG GAG AAC AAC CCT GGT CCC TTC GTT CCT ATT TCC CAG 2916
 Arg Pro Leu Glu Glu Asn Asn Pro Gly Pro Phe Val Pro Ile Ser Gln
 895 900 905
 CAT GGA TGG CGC AAC ATC CGG CTT TTC ATT TCG TCC ACT TTC CGA GAC 2964
 His Gly Trp Arg Asn Ile Arg Leu Phe Ile Ser Ser Thr Phe Arg Asp
 910 915 920
 ATG CAT GGG GAA CGA GAC TTG CTG ATG CGA TCT GTT CTG CCA GCG CTG 3012
 Met His Gly Glu Arg Asp Leu Leu Met Arg Ser Val Leu Pro Ala Leu
 925 930 935
 CAG GCC CGA GCG TTC CCC CAC CGC ATC AGC CTT CAC GCC ATT GAC CTG 3060
 Gln Ala Arg Ala Phe Pro His Arg Ile Ser Leu His Ala Ile Asp Leu
 940 945 950
 CGC TGG GGA ATC ACG GAG GAA GAG ACC CGC AGG AAC AGA CAA CTG GAA 3108
 Arg Trp Gly Ile Thr Glu Glu Glu Thr Arg Arg Asn Arg Gln Leu Glu
 955 960 965 970
 GTG TGC CTT GGG GAG GTG GAG AAC TCT CAG CTG TTC GTG GGG ATC CTG 3156

Val Cys Leu Gly Glu Val Glu Asn Ser Gln Leu Phe Val Gly Ile Leu
 975 980 985
 GGC TCC CGC TAT GGC TAT ACT CCC CCC AGC TAT GAT CTG CCT GAC CAC 3204
 Gly Ser Arg Tyr Gly Tyr Thr Pro Pro Ser Tyr Asp Leu Pro Asp His
 990 995 1000
 CCC CAC TTT CAC TGG ACC CAG CGA TAC CCT TCG GGG CGC TCT GTA ACA 3252
 Pro His Phe His Trp Thr Gln Arg Tyr Pro Ser Gly Arg Ser Val Thr
 1005 1010 1015
 GAG ATG GAG GTG ATG CAG TTC CTG AAC CGT GGC CAA CGC TCG GAA CCC 3300
 Glu Met Glu Val Met Gln Phe Leu Asn Arg Gly Gln Arg Ser Glu Pro
 1020 1025 1030
 TCT GAC CAA GCT CTC ATC TAC TTC CGA GAT CCT GGT TTC CTT AGC TCT 3348
 Ser Asp Gln Ala Leu Ile Tyr Phe Arg Asp Pro Gly Phe Leu Ser Ser
 1035 1040 1045 1050
 GTG CCA GAT GTC TGG AAA CCT GAC TTT ATT TCC GAG TCA GAA GAG GCT 3396
 Val Pro Asp Val Trp Lys Pro Asp Phe Ile Ser Glu Ser Glu Glu Ala
 1055 1060 1065
 GCA CAT CGG GTC TCA GAA CTG AAG AGA TTC CTA CAG GAA CAG AAA GAG 3444
 Ala His Arg Val Ser Glu Leu Lys Arg Phe Leu Gln Glu Gln Lys Glu
 1070 1075 1080
 GTT ACC TGC CGC AGG TAC TCC TGT GAA TGG GGA GGC GTA GCA GCC GGC 3492
 Val Thr Cys Arg Arg Tyr Ser Cys Glu Trp Gly Gly Val Ala Ala Gly
 1085 1090 1095
 CGG CCC TAT ACT GGG GGC CTG GAG GAG TTT GGA CAG TTG GTT CTC CAA 3540
 Arg Pro Tyr Thr Gly Gly Leu Glu Glu Phe Gly Gln Leu Val Leu Gln
 1100 1105 1110
 GAT GTG TGG AGC GTG ATC CAG AAG CGT TAC CTG CAG CCT GGG GCC CAG 3588
 Asp Val Trp Ser Val Ile Gln Lys Arg Tyr Leu Gln Pro Gly Ala Gln

1115	1120	1125	1130
TTG GAG CAG CCA GGA TCC ATC TCA GAA GAG GAT TTG ATC CAG GCC AGC	3636		
Leu Glu Gln Pro Gly Ser Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ile Gln Ala Ser			
1135	1140	1145	
TTT CAG CAG CTG AAG AGC CCA CCG AGT CCC GCA CGG CCA CGC CTT CTT	3684		
Phe Gln Gln Leu Lys Ser Pro Pro Ser Pro Ala Arg Pro Arg Leu Leu			
1150	1155	1160	
CAG GAT ACC GTG CAA CAG CTG ATG CTG CCC CAC GGG AGG CTG AGC CTA	3732		
Gln Asp Thr Val Gln Gln Leu Met Leu Pro His Gly Arg Leu Ser Leu			
1165	1170	1175	
GTG ATT GGG CAG GCA GGA CAG GGA AAG ACT GCC TTC CTG GCA TCC CTT	3780		
Val Ile Gly Gln Ala Gly Gln Gly Lys Thr Ala Phe Leu Ala Ser Leu			
1180	1185	1190	
GTG TCG GCC CTG AAG GTT CCC GAC CAG CCC AAT GTG GCC CCG TTC GTT	3828		
Val Ser Ala Leu Lys Val Pro Asp Gln Pro Asn Val Ala Pro Phe Val			
1195	1200	1205	1210
TTC TTC CAC TTT TCA GCA GCC CGC CCT GAC CAG TGT CTT GCT TTC AAC	3876		
Phe Phe His Phe Ser Ala Ala Arg Pro Asp Gln Cys Leu Ala Phe Asn			
1215	1220	1225	
CTC CTC AGA CGC CTC TGT ACC CAT CTG CAT CAA AAA CTG GGA GAG CCG	3924		
Leu Leu Arg Arg Leu Cys Thr His Leu His Gln Lys Leu Gly Glu Pro			
1230	1235	1240	
AGC GCT CTC CCC AGC ACT TAC AGA GGC CTG GTG TGG GAA CTG CAG CAG	3972		
Ser Ala Leu Pro Ser Thr Tyr Arg Gly Leu Val Trp Glu Leu Gln Gln			
1245	1250	1255	
AAG CTG CTC CTC AAA TCT GCC CAG TGG CTG CAA CCA GGC CAG ACT TTG	4020		
Lys Leu Leu Leu Lys Ser Ala Gln Trp Leu Gln Pro Gly Gln Thr Leu			
1260	1265	1270	

GTC CTT ATT ATC GAC GGG GCA GAT AAG TTG GTG GAC CAT AAT GGA CAG 4068
 Val Leu Ile Ile Asp Gly Ala Asp Lys Leu Val Asp His Asn Gly Gln
 1275 1280 1285 1290
 CTG ATT TCA GAC TGG ATC CCC AAG TCT CTT CCG CGG CGA GTA CAC CTG 4116
 Leu Ile Ser Asp Trp Ile Pro Lys Ser Leu Pro Arg Arg Val His Leu
 1295 1300 1305
 GTG CTG AGT GTG TCT AGT GAC TCA GGC CTG GGA GAG ACC CTT CAG CAA 4164
 Val Leu Ser Val Ser Ser Asp Ser Gly Leu Gly Glu Thr Leu Gln Gln
 1310 1315 1320
 AGT CAG AGT GCT TAT GTG GTG GCC TTG GGG TCT TTG GTC CCG TCT TCA 4212
 Ser Gln Ser Ala Tyr Val Val Ala Leu Gly Ser Leu Val Pro Ser Ser
 1325 1330 1335
 AGG GCT CAG CTT GTG AGA GAA GAG CTA GCA CTG TAT GGG AAA CGG CTG 4260
 Arg Ala Gln Leu Val Arg Glu Glu Leu Ala Leu Tyr Gly Lys Arg Leu
 1340 1345 1350
 GAG GAG TCA CCT TTT AAC AAC CAG ATG CGG CTG CTG CTG GCA AAG CAG 4308
 Glu Glu Ser Pro Phe Asn Asn Gln Met Arg Leu Leu Leu Ala Lys Gln
 1355 1360 1365 1370
 GGG TCA AGC CTG CCA CTG TAC CTG CAC CTC GTC ACT GAC TAC CTG AGG 4356
 Gly Ser Ser Leu Pro Leu Tyr Leu His Leu Val Thr Asp Tyr Leu Arg
 1375 1380 1385
 CTT TTC ACA CTG TAC GAA CAG GTG TCT GAG AGA CTT CGA ACC CTG CCC 4404
 Leu Phe Thr Leu Tyr Glu Gln Val Ser Glu Arg Leu Arg Thr Leu Pro
 1390 1395 1400
 GCC ACT CTC CCA CTG CTG CTG CAG CAC ATC CTG AGC ACC TTG GAG CAA 4452
 Ala Thr Leu Pro Leu Leu Leu Gln His Ile Leu Ser Thr Leu Glu Gln
 1405 1410 1415
 GAG CAT GGC CAT AAC GTC CTT CCT CAA GCT TTG ACT GCC CTT GAG GTC 4500

Glu His Gly His Asn Val Leu Pro Gln Ala Leu Thr Ala Leu Glu Val
 1420 1425 1430
 ACG CAC AGT GGT CTG ACT GTG GAC CAG CTG CAT GCA GTC CTG AGC ACG 4548
 Thr His Ser Gly Leu Thr Val Asp Gln Leu His Ala Val Leu Ser Thr
 1435 1440 1445 1450
 TGG TTG ACT TTG CCC AAG GAG ACT AAG AGC TGG GAA GAG GCA GTG GCT 4596
 Trp Leu Thr Leu Pro Lys Glu Thr Lys Ser Trp Glu Glu Ala Val Ala
 1455 1460 1465
 GCC AGT CAC AGT GGA AAC CTC TAC CCC TTG GCT CCA TTT GCC TAC CTT 4644
 Ala Ser His Ser Gly Asn Leu Tyr Pro Leu Ala Pro Phe Ala Tyr Leu
 1470 1475 1480
 GTC CAG AGT CTA CGC AGT TTA CTA GGC GAG GGC CCC GTG GAG CGC CCT 4692
 Val Gln Ser Leu Arg Ser Leu Leu Gly Glu Gly Pro Val Glu Arg Pro
 1485 1490 1495
 GGC GCC CGT CTC TGC CTC TCT GAT GGG CCT CTG AGG ACA GCA GTT AAA 4740
 Gly Ala Arg Leu Cys Leu Ser Asp Gly Pro Leu Arg Thr Ala Val Lys
 1500 1505 1510
 CGT CGC TAT GGG AAA AGG CTG GGG CTA GAG AAG ACT GCG CAT GTC CTC 4788
 Arg Arg Tyr Gly Lys Arg Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala His Val Leu
 1515 1520 1525 1530
 ATT GCA GCT CAC CTC TGG AAG ATG TGT GAC CCT GAT GCC TCA GGC ACC 4836
 Ile Ala Ala His Leu Trp Lys Met Cys Asp Pro Asp Ala Ser Gly Thr
 1535 1540 1545
 TTC CGA AGT TGC CCT CCC GAG GCT CTG AAA GAT TTA CCT TAC CAC CTG 4884
 Phe Arg Ser Cys Pro Pro Glu Ala Leu Lys Asp Leu Pro Tyr His Leu
 1550 1555 1560
 CTC CAG AGC GGG AAC CAT GGT CTC CTT GCA AAG TTC CTT ACC AAC CTC 4932
 Leu Gln Ser Gly Asn His Gly Leu Leu Ala Lys Phe Leu Thr Asn Leu

1565	1570	1575	
CAT GTG GTG GCT GCA TAT CTG GAA GTG GGT CTA GTC CCG GAC CTC TTG	4980		
His Val Val Ala Ala Tyr Leu Glu Val Gly Leu Val Pro Asp Leu Leu			
1580	1585	1590	
GAG GCT TAC GAG CTC TAT GCT TCT TCA AAG CCT GAA GTG AAC CAG AAG	5028		
Glu Ala Tyr Glu Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Pro Glu Val Asn Gln Lys			
1595	1600	1605	1610
CTC CCG GAG GCA GAT GTT GCT GTA TTC CAC AAC TTC CTG AAA CAA CAG	5076		
Leu Pro Glu Ala Asp Val Ala Val Phe His Asn Phe Leu Lys Gln Gln			
1615	1620	1625	
GCT TCA CTC CTT ACC CAG TAT CCT TTG CTC CTG CTC CAG CAG GCA GCT	5124		
Ala Ser Leu Leu Thr Gln Tyr Pro Leu Leu Leu Leu Gln Gln Ala Ala			
1630	1635	1640	
AGC CAG CCT GAA GAG TCA CCT GTT TGC TGC CAG GCC CCC CTG CTC ACC	5172		
Ser Gln Pro Glu Glu Ser Pro Val Cys Cys Gln Ala Pro Leu Leu Thr			
1645	1650	1655	
CAG CGG TGG CAC AAC CAG TGC ATA CTG AAA TGG ATT AAT AAA CCC CAG	5220		
Gln Arg Trp His Asn Gln Cys Ile Leu Lys Trp Ile Asn Lys Pro Gln			
1660	1665	1670	
ACC TTG AAG GGT CAG CAA AGC TTG TCT CTG CCA ATT TCC TCA TCC CCA	5268		
Thr Leu Lys Gly Gln Gln Ser Leu Ser Leu Pro Ile Ser Ser Ser Pro			
1675	1680	1685	1690
ACT GCT GTG GCC TTC TCT CCT AAT GGG CAA AGA GCA GCT GTG GGG ACT	5316		
Thr Ala Val Ala Phe Ser Pro Asn Gly Gln Arg Ala Ala Val Gly Thr			
1695	1700	1705	
GCT GGT GGG ACA ATT TAC CTG TTG AAC TTG AGA ACC TGG CAG GAG GAG	5364		
Ala Gly Gly Thr Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Arg Thr Trp Gln Glu Glu			
1710	1715	1720	

AAG GCT CTG GTG AGT GGC TGT GAT GGG ATT TCC TCT TTC GCG TTC CTG 5412
 Lys Ala Leu Val Ser Gly Cys Asp Gly Ile Ser Ser Phe Ala Phe Leu

1725

1730

1735

TCA GAC ACT GCT CTT TTC CTT ACC ACC TTC GAT GGG CTC CTG GAG CTT 5460
 Ser Asp Thr Ala Leu Phe Leu Thr Thr Phe Asp Gly Leu Leu Glu Leu

1740

1745

1750

TGG GAC CTG CAA CAT GGT TGT TGG GTG TTC CAG ACC AAG GCC CAC CAG 5508
 Trp Asp Leu Gln His Gly Cys Trp Val Phe Gln Thr Lys Ala His Gln

1755

1760

1765

1770

TAC CAA ATC ACT GGC TGC TGC CTG AGC CCA GAC CGC CGC CTG CTG GCC 5556
 Tyr Gln Ile Thr Gly Cys Cys Leu Ser Pro Asp Arg Arg Leu Leu Ala

1775

1780

1785

ACC GTG TGT TTG GGA GGA TAC GTA AAG CTG TGG GAC ACA GTC CAG GGC 5604
 Thr Val Cys Leu Gly Gly Tyr Val Lys Leu Trp Asp Thr Val Gln Gly

1790

1795

1800

CAG CTG GCT TTC CAG TAC ACC CAT CCC AAG TCT CTA AAC TGC ATC ACC 5652
 Gln Leu Ala Phe Gln Tyr Thr His Pro Lys Ser Leu Asn Cys Ile Thr

1805

1810

1815

TTC CAC CCA GAG GGG CAG GTG GTA GCC ACA GGC AAC TGG TCT GGC ATC 5700
 Phe His Pro Glu Gly Gln Val Val Ala Thr Gly Asn Trp Ser Gly Ile

1820

1825

1830

GTG ACC TTC TTC CAG GCA GAT GGA CTC AAA GTC ACC AAG GAA CTA GGG 5748
 Val Thr Phe Phe Gln Ala Asp Gly Leu Lys Val Thr Lys Glu Leu Gly

1835

1840

1845

1850

GGC CCA GGA CCC TCT GTT CGT ACG CTG GCA TTC AGT GCA CCC GGG AAG 5796
 Gly Pro Gly Pro Ser Val Arg Thr Leu Ala Phe Ser Ala Pro Gly Lys

1855

1860

1865

GTT GTG GCT CTA GGC CGG ATA GAT GGG ACA GTG GAG CTG TGG GCC TGG 5844

Val Val Ala Leu Gly Arg Ile Asp Gly Thr Val Glu Leu Trp Ala Trp
 1870 1875 1880
 CAA GAG GGC ACA CGG CTG GCA GCC TTC CCT GCA CAG TGT GGC GGT GTC 5892
 Gln Glu Gly Thr Arg Leu Ala Ala Phe Pro Ala Gln Cys Gly Gly Val
 1885 1890 1895
 TCC ACC GTT CTT TTC TTG CAT GCT GGA GGC CGG TTC CTG ACG GCT GGG 5940
 Ser Thr Val Leu Phe Leu His Ala Gly Gly Arg Phe Leu Thr Ala Gly
 1900 1905 1910
 GAA GAT GGC AAG GCT CAG TTA TGG TCA GGA TTT CTT GGC CGG CCC AGG 5988
 Glu Asp Gly Lys Ala Gln Leu Trp Ser Gly Phe Leu Gly Arg Pro Arg
 1915 1920 1925 1930
 GGT TGC CTG GGC TCT CTT TAT CTT TCT CCT GCG CTC TCT GTG GCT CTC 6036
 Gly Cys Leu Gly Ser Leu Tyr Leu Ser Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu
 1935 1940 1945
 AAC CCA GAC GGT GAC CAG GTG GCT GTT GGG TAC CGA GGA GAT GGC ATT 6084
 Asn Pro Asp Gly Asp Gln Val Ala Val Gly Tyr Arg Gly Asp Gly Ile
 1950 1955 1960
 AAA ATC TAC AGA ATT TCT TCA GGT CCC CAG GAG GCT CAA TGC CAA GAG 6132
 Lys Ile Tyr Arg Ile Ser Ser Gly Pro Gln Glu Ala Gln Cys Gln Glu
 1965 1970 1975
 CTA AAT GTG GCG GTG TCT GCA CTG GTC TGG CTG AGT CCC AGC GTC TTG 6180
 Leu Asn Val Ala Val Ser Ala Leu Val Trp Leu Ser Pro Ser Val Leu
 1980 1985 1990
 GTG AGT GGT GCA GAA GAT GGC TCC CTG CAT GGC TGG ATG CTC AGG AGA 6228
 Val Ser Gly Ala Glu Asp Gly Ser Leu His Gly Trp Met Leu Arg Arg
 1995 2000 2005 2010
 AAC TCC CTT CAG TCC CTG TGG CTG TCA TCC GTG TGC CAG AAG CCT GTG 6276
 Asn Ser Leu Gln Ser Leu Trp Leu Ser Ser Val Cys Gln Lys Pro Val

2015	2020	2025	
CTG GGG CTG GCT GCC TCC CAG GAG TTC TTG GCT TCT GCC TCA GAG GAC	6324		
Leu Gly Leu Ala Ala Ser Gln Glu Phe Leu Ala Ser Ala Ser Glu Asp			
2030	2035	2040	
TTC ACG GTG CGA CTG TGG CCA AGA CAG CTG CTG ACA CAG CCA CAT GCA	6372		
Phe Thr Val Arg Leu Trp Pro Arg Gln Leu Leu Thr Gln Pro His Ala			
2045	2050	2055	
GTA GAA GAG TTG CCC TGT GCG GCT GAA CTC CGG GGA CAC GAG GGG CCG	6420		
Val Glu Glu Leu Pro Cys Ala Ala Glu Leu Arg Gly His Glu Gly Pro			
2060	2065	2070	
GTG TGC TGC TGT AGC TTC AGC CCG GAT GGA CGC ATC TTG GCC ACA GCG	6468		
Val Cys Cys Cys Ser Phe Ser Pro Asp Gly Arg Ile Leu Ala Thr Ala			
2075	2080	2085	2090
GGC AGG GAT CGG AAT CTC CTC TGC TGG GAC GTC AAG GTA GCC CAA GCC	6516		
Gly Arg Asp Arg Asn Leu Leu Cys Trp Asp Val Lys Val Ala Gln Ala			
2095	2100	2105	
CCT CTC CTG ATT CAC ACG TTC TCG TCC TGT CAT CGA GAC TGG ATC ACT	6564		
Pro Leu Leu Ile His Thr Phe Ser Ser Cys His Arg Asp Trp Ile Thr			
2110	2115	2120	
GGC TGT ACG TGG ACC AAA GAC AAC ATC CTG ATC TCC TGC TCT AGT GAT	6612		
Gly Cys Thr Trp Thr Lys Asp Asn Ile Leu Ile Ser Cys Ser Ser Asp			
2125	2130	2135	
GGC TCT GTG GGA CTC TGG AAC CCA GAG GCA GGA CAG CAA CTT GGC CAG	6660		
Gly Ser Val Gly Leu Trp Asn Pro Glu Ala Gly Gln Gln Leu Gly Gln			
2140	2145	2150	
TTC CCA GGT CAC CAG AGT GCC GTG AGC GCT GTG GTT GCT GTG GAG GAA	6708		
Phe Pro Gly His Gln Ser Ala Val Ser Ala Val Val Ala Val Glu Glu			
2155	2160	2165	2170

CAC ATT GTA TCT GTG AGT CGG GAT GGG ACC TTG AAA GTG TGG GAC CGT 6756
 His Ile Val Ser Val Ser Arg Asp Gly Thr Leu Lys Val Trp Asp Arg

2175

2180

2185

CAG GGT GTG GAG CTG ACC AGC ATC CCT GCC CAT TCC GGA CCC ATT AGC 6804
 Gln Gly Val Glu Leu Thr Ser Ile Pro Ala His Ser Gly Pro Ile Ser

2190

2195

2200

CAG TGT GCG GCT GCT CTG GAA CCC CGT CCA GCT GGA CAG CCT GGA TCA 6852
 Gln Cys Ala Ala Ala Leu Glu Pro Arg Pro Ala Gly Gln Pro Gly Ser

2205

2210

2215

GAG CTT ATG GTG GTG ACT GTT GGA CTG GAT GGG GCC ACA AAG CTG TGG 6900
 Glu Leu Met Val Val Thr Val Gly Leu Asp Gly Ala Thr Lys Leu Trp

2220

2225

2230

CAT CCC CTG TTG GTG TGC CAA ATA CAT ACC CTG CAG GGA CAC AGT GGT 6948
 His Pro Leu Leu Val Cys Gln Ile His Thr Leu Gln Gly His Ser Gly

2235

2240

2245

2250

CCA GTC ACA GCT GCT GCT GCT TCA GAG GCC TCA GGC CTC CTG CTG ACC 6996
 Pro Val Thr Ala Ala Ala Ala Ser Glu Ala Ser Gly Leu Leu Leu Thr

2255

2260

2265

TCA GAC AAT AGC TCT GTA CGA CTC TGG CAG ATC CCT AAG GAA GCA GAT 7044
 Ser Asp Asn Ser Ser Val Arg Leu Trp Gln Ile Pro Lys Glu Ala Asp

2270

2275

2280

GAT ACC TGC AAA CCT AGG AGT TCT GCG GTC ATC ACC GCT GTG GCG TGG 7092
 Asp Thr Cys Lys Pro Arg Ser Ser Ala Val Ile Thr Ala Val Ala Trp

2285

2290

2295

GCA CCA GAT GGT TCT CTG GTG GTG TCT GGA AAT GAA GCT GGG GAA CTA 7140
 Ala Pro Asp Gly Ser Leu Val Val Ser Gly Asn Glu Ala Gly Glu Leu

2300

2305

2310

ACG CTG TGG CAG AAA GCG CAG GCT GTG GCT ACG GCA CGG GCT CCA GGC 7188

Thr Leu Trp Gln Lys Ala Gln Ala Val Ala Thr Ala Arg Ala Pro Gly
 2315 2320 2325 2330
 CGC GTC AGT GAC CTG ATC TGG TGC TCC GCA AAT GCA TTC TTT GTT CTC 7236
 Arg Val Ser Asp Leu Ile Trp Cys Ser Ala Asn Ala Phe Phe Val Leu
 2335 2340 2345
 AGT GCT AAT GAA AAT GTC AGT GAG TGG CAA GTG GAA CTG AGG AAA GGT 7284
 Ser Ala Asn Glu Asn Val Ser Glu Trp Gln Val Glu Leu Arg Lys Gly
 2350 2355 2360
 TCA ACA TGC ACC AAT TTC AGA CTT TAT CTG AAG AGA GTT CTG CAG GAG 7332
 Ser Thr Cys Thr Asn Phe Arg Leu Tyr Leu Lys Arg Val Leu Gln Glu
 2365 2370 2375
 GAC TTG GGA GTC TTG ACA GGT ATG GCC CTG GCG CCT GAC GGC CAG TCT 7380
 Asp Leu Gly Val Leu Thr Gly Met Ala Leu Ala Pro Asp Gly Gln Ser
 2380 2385 2390
 CTC ATT TTG ATG AAA GAG GAT GTA GAA TTG CTA CAG ATG AAG CCC GGG 7428
 Leu Ile Leu Met Lys Glu Asp Val Glu Leu Leu Gln Met Lys Pro Gly
 2395 2400 2405 2410
 TCT ACT CCA TCT TCG ATC TGC AGG AGG TAT GCA GTG CAT TCT TCT ATA 7476
 Ser Thr Pro Ser Ser Ile Cys Arg Arg Tyr Ala Val His Ser Ser Ile
 2415 2420 2425
 CTG TGC ACC AGC AAA GAC TAT GGC CTG TTT TAC CTG CAG CAG GGA AAC 7524
 Leu Cys Thr Ser Lys Asp Tyr Gly Leu Phe Tyr Leu Gln Gln Gly Asn
 2430 2435 2440
 TCT GGA TCT CTT TCT ATC TTG GAG CAG GAG GAG TCA GGG AAG TTT GAA 7572
 Ser Gly Ser Leu Ser Ile Leu Glu Gln Glu Glu Ser Gly Lys Phe Glu
 2445 2450 2455
 AAG ACC CTG GAC TTC AAT CTG AAC TTA AAT AAT CCT AAT GGG TCC CCA 7620
 Lys Thr Leu Asp Phe Asn Leu Asn Leu Asn Asn Pro Asn Gly Ser Pro

2460 2465 2470
 GTA TCA ATC ACT CAG GCT GAA CCT GAG TCT GGG TCC TCG CTT TTG TGT 7668
 Val Ser Ile Thr Gln Ala Glu Pro Glu Ser Gly Ser Ser Leu Leu Cys
 2475 2480 2485 2490
 GCT ACC TCT GAT GGG ATG CTG TGG AAC TTA TCT GAG TGT ACC CCA GAA 7716
 Ala Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Asn Leu Ser Glu Cys Thr Pro Glu
 2495 2500 2505
 GGA GAG TGG GTC GTA GAT AAC ATC TGG CAG AAA AAA TCA AGA AAC CCT 7764
 Gly Glu Trp Val Val Asp Asn Ile Trp Gln Lys Lys Ser Arg Asn Pro
 2510 2515 2520
 AAA AGT CGA ACT CCG GGG ACA GAT TCG TCC CCA GGC TTA TTC TGC ATG 7812
 Lys Ser Arg Thr Pro Gly Thr Asp Ser Ser Pro Gly Leu Phe Cys Met
 2525 2530 2535
 GAT AGC TGG GTA GAA CCC ACA CAT TTA AAG GCA CGG CAG TGT AAA AAG 7860
 Asp Ser Trp Val Glu Pro Thr His Leu Lys Ala Arg Gln Cys Lys Lys
 2540 2545 2550
 ATT CAC TTG GGC TCT GTC ACG GCC CTC CAT GTG CTG CCC GGA TTG CTG 7908
 Ile His Leu Gly Ser Val Thr Ala Leu His Val Leu Pro Gly Leu Leu
 2555 2560 2565 2570
 GTG ACT GCT TCA GAG GAC AGA GAT GTT AAG CTG TGG GAG AGA CCC AGT 7956
 Val Thr Ala Ser Glu Asp Arg Asp Val Lys Leu Trp Glu Arg Pro Ser
 2575 2580 2585
 ATG CAG CTG CTC GGC TTG TTC CGA TGT GAA GGG CCG GTG AGC TGT CTG 8004
 Met Gln Leu Leu Gly Leu Phe Arg Cys Glu Gly Pro Val Ser Cys Leu
 2590 2595 2600
 GAA CCT TGG ATG GAG CCC AGC TCT CCC CTG CAG CTT GCT GTG GGA GAT 8052
 Glu Pro Trp Met Glu Pro Ser Ser Pro Leu Gln Leu Ala Val Gly Asp
 2605 2610 2615

GCA CAA GGA AAC TTG TAT TTT CTA TCT TGG GAA TGAAGATGAA 8095
 Ala Gln Gly Asn Leu Tyr Phe Leu Ser Trp Glu ***
 2620 2625 2629
 GAATCAGGAC AAAGATGGTG TCACCGGATG ATGGTCACCT GAAGACACCA GTGTCTATAT 8155
 TCTTAATAAG GTTATAAAAT AAAGTGTGG AAGATCTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 8215

配列番号 : 2

配列の長さ : 核酸 = 487、アミノ酸 = 162

配列の型 : 核酸及びアミノ酸

トポロジー : 直鎖状二本鎖

配列の種類 : cDNA

起源 : 生物名 ヒト

配列

AAG TTC GCG CAG TTT GAC GAG TAC CAG CTG GCT AAG TAC AAC CCT CGG 48
 Lys Phe Ala Gln Phe Asp Glu Tyr Gln Leu Ala Lys Tyr Asn Pro Arg
 1 5 10 15
 AAG CAC CGG GCC AAG AGA CAC CCC CGC CGG CCA CCC CGC TCT CCA GGG 96
 Lys His Arg Ala Lys Arg His Pro Arg Arg Pro Pro Arg Ser Pro Gly
 20 25 30
 ATG GAG CCT CCA TTT TCT CAC AGA TGT TTT CCA AGG TAC ATA GGG TTT 144
 Met Glu Pro Pro Phe Ser His Arg Cys Phe Pro Arg Tyr Ile Gly Phe
 35 40 45
 CTC AGA GAA GAG CAG AGA AAG TTT GAG AAG GCC GGT GAT ACA GTG TCA 192
 Leu Arg Glu Glu Gln Arg Lys Phe Glu Lys Ala Gly Asp Thr Val Ser
 50 55 60
 GAG AAA AAG AAT CCT CCA AGG TTC ACC CTG AAG AAG CTG GTT CAG CGA 240
 Glu Lys Lys Asn Pro Pro Arg Phe Thr Leu Lys Lys Leu Val Gln Arg
 65 70 75 80

CTG CAC ATC CAC AAG CCT GCC CAG CAC GTT CAA GCC CTG CTG GGT TAC 288
 Leu His Ile His Lys Pro Ala Gln His Val Gln Ala Leu Leu Gly Tyr
 85 90 95

AGA TAC CCC TCC AAC CTA CAG CTC TTT TCT CGA AGT CGC CTT CCT GGG 336
 Arg Tyr Pro Ser Asn Leu Gln Leu Phe Ser Arg Ser Arg Leu Pro Gly
 100 105 110

CCT TGG GAT TCT AGC AGA GCT GGG AAG AGG ATG AAG CTG TCT AGG CCA 384
 Pro Trp Asp Ser Ser Arg Ala Gly Lys Arg Met Lys Leu Ser Arg Pro
 115 120 125

GAG ACC TGG GAG CGG GAG CTG AGC CTA CGG GGG AAC AAA GCG TCG GTC 432
 Glu Thr Trp Glu Arg Glu Leu Ser Leu Arg Gly Asn Lys Ala Ser Val
 130 135 140

TGG GAG GAA CTC ATT GAA AAT GGG AAG CTT CCC TTC ATG GCC ATG CTC 480
 Trp Glu Glu Leu Ile Glu Asn Gly Lys Leu Pro Phe Met Ala Met Leu
 145 150 155 160

AGC ATC T 487
 Ser Ile
 162

配列番号：3

配列の長さ：3 4 7

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源：生物名 ラット

配列

CGGATGTAGA TGGTCAGGAG ATTAAGTGAT GCTGCCTGCA CCTTATCTTT GCAGGTATTG 60
 GGTCATTCTC AGAAATTATT TTATCAGGCA GATTCAATAA GCAAGATAGT TTAGGGCGTG 120

AAGCTATGGG ATCAGTGACC AAGATGCCAA TCTCTTCTAC CCTCTCTCC TAG GCA TCT 178

*** Ala Ser

1

TTG TAT GCT AGG CAG CAG CTT AAC CTC CGG GAC ATA GCC AAT ATA GTG 226

Leu Tyr Ala Arg Gln Gln Leu Asn Leu Arg Asp Ile Ala Asn Ile Val

5

10

15

TTG GCC GTG GCT GCC CTC TTG CCA GCC TGC CGC CCC CAT GTA CGA CGG 274

Leu Ala Val Ala Ala Leu Leu Pro Ala Cys Arg Pro His Val Arg Arg

20

25

30

TAT TAC TCT GCC ATT GTT CAC CTG CCT TCA GAC TGG AAC CAG GTA GCC 322

Tyr Tyr Ser Ala Ile Val His Leu Pro Ser Asp Trp Asn Gln Val Ala

35

40

45

50

GAG TTC TAC CAG GTA TGG TAC TTA G

347

Glu Phe Tyr Gln Val Trp Tyr Leu

55

配列番号 : 4

配列の長さ : 4 0 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

起源 : 生物名 ラット

直接の起源 : プラスミド R a P C 5 3

配列

AGC TTG GGG GGA GAA GAA GAA GAA GTG GTG GGG GCA CCG GTC CTA AAA 48

Ser Leu Gly Gly Glu Glu Glu Glu Val Val Gly Ala Pro Val Leu Lys

1

5

10

15

CTC ACA TCT GGA GAC TCT GAC TCT CAC CCT GAA ACC ACT GAC CAG ATC 96

Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ser His Pro Glu Thr Thr Asp Gln Ile
 20 25 30
 CTG CAG GAG AAG AAG ATG GCT CTC TTG ACC TTG CTG TGC TCA GCT ATG 144
 Leu Gln Glu Lys Lys Met Ala Leu Leu Thr Leu Leu Cys Ser Ala Met
 35 40 45
 GCC TCA AGT GTG AAT GTG AAA GAT GCC TCC GAT CCT ACC CGG GCA TCT 192
 Ala Ser Ser Val Asn Val Ile Tyr Ala Ser Asp Pro Thr Arg Ala Ser
 50 55 60
 ATC CAT GAA GTC TGC AGT GCG CTG GCC CCC TTG GAA CCT GAG TTC ATC 240
 Ile His Glu Val Cys Ser Ala Leu Ala Pro Leu Glu Pro Glu Phe Ile
 65 70 75 80
 CTT AAG GCA TCT TTG TAT GCT AGG CAG CAG CTT AAC CTC CGG GAC ATA 288
 Leu Lys Ala Ser Leu Tyr Ala Arg Gln Gln Leu Asn Leu Arg Asp Ile
 85 90 95
 GCC AAT ATA GTG TTG GAA GTG GCT GCC CTC TTG CCA GCC TGC CGC CCC 336
 Ala Asn Ile Val Lys Ala Val Ala Ala Leu Leu Pro Ala Cys Arg Pro
 100 105 110
 CAT GTA CGA CGG TAT TAC TCT GCC ATT GTT CAC CTG CCT TCA GAC TGG 384
 His Val Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Ile Val His Leu Pro Ser Asp Trp
 115 120 125
 ATC CAG GTA GCC GAG TTC TAC CAG 408
 Ile Glu Val Ala Glu Phe Tyr Gln
 130 135

配列番号: 5

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はA またはG、Y はC またはT を示す。

配列

CARTTYGAYG ARTAYCA

17

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はA またはG、N はA、G、C またはT、W はA またはT を示す。

配列

ARCATNGCCA TRWANGG

17

配列番号：7

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はSA またはG、Y はC またはT、I はinosine を示す。

配列

AARTTYGCIC ARTTYGAYGA RTA

23

配列番号：8

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はA またはG、Y はC またはT、I はinosine を示す。

配列

TTYGAYGART AYCARYTIGC IAARTA

26

配列番号：9

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はA またはG、I はinosine、K はG またはT を示す。

配列

ARRTTICKIA RCATIGCCAT RAAIGG

26

配列番号：10

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：R はA またはG、I はinosine、K はG またはT を示す。

配列

TTRCAIARRT TICKIARCAT IGCCAT

26

配列番号：1 1

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGGGATGGA GCCTCCATTT TCT

23

配列番号：1 2

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCAATGAGTT CCTCCCAGAC CGA

23

配列番号：1 3

配列の長さ：核酸 = 8 8 3 9、アミノ酸 = 2 6 2 5

配列の型：核酸及びアミノ酸

トポロジー：直鎖状二本鎖

配列の種類：cDNA

起源：生物名 ヒト

配列

AGATCCGCAT CCGGCGCCTC CCCC GGCTGC CACCCTTCCC ACCGGCAGAA TCCAGAGCGA 60

AGTTTCTGCT TCCTGCTGCG GGAATCGGAC GCCCCAGGTC AGGCACCCAG GGTTCACAGC 120

CCCAGTCTAA GGCATATACA AGCTGAGTTT CAGCC ATG GAA AAA CTC CAT	170
Met Glu Lys Leu His	
1 5	
GGG CAT GTG TCT GCC CAT CCA GAC ATC CTC TCC TTG GAG AAC CGG TGC	218
Gly His Val Ser Ala His Pro Asp Ile Leu Ser Leu Glu Asn Arg Cys	
10 15 20	
CTG GCT ATG CTC CCT GAC TTA CAG CCC TTG GAG AAA CTA CAT CAG CAT	266
Leu Ala Met Leu Pro Asp Leu Gln Pro Leu Glu Lys Leu His Gln His	
25 30 35	
GTA TCT ACC CAC TCA GAT ATC CTC TCC TTG AAG AAC CAG TGC CTA GCC	314
Val Ser Thr His Ser Asp Ile Leu Ser Leu Lys Asn Gln Cys Leu Ala	
40 45 50	
ACG CTT CCT GAC CTG AAG ACC ATG GAA AAA CCA CAT GGA TAT GTG TCT	362
Thr Leu Pro Asp Leu Lys Thr Met Glu Lys Pro His Gly Tyr Val Ser	
55 60 65	
GCC CAC CCA GAC ATC CTC TCC TTG GAG AAC CAG TGC CTG GCC ACA CTT	410
Ala His Pro Asp Ile Leu Ser Leu Glu Asn Gln Cys Leu Ala Thr Leu	
70 75 80 85	
TCT GAC CTG AAG ACC ATG GAG AAA CCA CAT GGA CAT GTT TCT GCC CAC	458
Ser Asp Leu Lys Thr Met Glu Lys Pro His Gly His Val Ser Ala His	
90 95 100	
CCA GAC ATC CTC TCC TTG GAG AAC CGA TGC CTG GCC ACC CTC TCT AGT	506
Pro Asp Ile Leu Ser Leu Glu Asn Arg Cys Leu Ala Thr Leu Ser Ser	
105 110 115	
CTA AAG AGC ACT GTG TCT GCC AGC CCC TTG TTC CAG AGT CTA CAG ATA	554
Leu Lys Ser Thr Val Ser Ala Ser Pro Leu Phe Gln Ser Leu Gln Ile	
120 125 130	
TCT CAC ATG ATG CAA GCT GAT TTG TAC CGT GTG AAC AAC AGC AAT TGC	602

Ser His Met Met Gln Ala Asp Leu Tyr Arg Val Asn Asn Ser Asn Cys
 135 140 145
 CTG CTC TCT GAG CCT CCA AGT TGG AGG GCT CAG CAT TTC TCT AAG GGA 650
 Leu Leu Ser Glu Pro Pro Ser Trp Arg Ala Gln His Phe Ser Lys Gly
 150 155 160 165
 CTA GAC CTT TCA ACC TGC CCT ATA GCC CTG AAA TCC ATC TCT GCC ACA 698
 Leu Asp Leu Ser Thr Cys Pro Ile Ala Leu Lys Ser Ile Ser Ala Thr
 170 175 180
 GAG ACA GCT CAG GAA GCA ACT TTG GGT CGT TGG TTT GAT TCA GAA GAG 746
 Glu Thr Ala Gln Glu Ala Thr Leu Gly Arg Trp Phe Asp Ser Glu Glu
 185 190 195
 AAG AAA GGG GCA GAG ACC CAA ATG CCT TCT TAT AGT CTG AGC TTG GGA 794
 Lys Lys Gly Ala Glu Thr Gln Met Pro Ser Tyr Ser Leu Ser Leu Gly
 200 205 210
 GAG GAG GAG GAG GTG GAG GAT CTG GCC GTG AAG CTC ACC TCT GGA GAC 842
 Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Leu Ala Val Lys Leu Thr Ser Gly Asp
 215 220 225
 TCT GAA TCT CAT CCA GAG CCT ACT GAC CAT GTC CTT CAG GAA AAG AAG 890
 Ser Glu Ser His Pro Glu Pro Thr Asp His Val Leu Gln Glu Lys Lys
 230 235 240 245
 ATG GCT CTA CTG AGC TTG CTG TGC TCT ACT CTG GTC TCA GAA GTA AAC 938
 Met Ala Leu Leu Ser Leu Leu Cys Ser Thr Leu Val Ser Glu Val Asn
 250 255 260
 ATG AAC AAT ACA TCT GAC CCC ACC CTG GCT GCC ATT TTT GAA ATC TGT 986
 Met Asn Asn Thr Ser Asp Pro Thr Leu Ala Ala Ile Phe Glu Ile Cys
 265 270 275
 CGT GAA CTT GCC CTC CTG GAG CCT GAG TTT ATC CTC AAG GCA TCT TTG 1034
 Arg Glu Leu Ala Leu Leu Glu Pro Glu Phe Ile Leu Lys Ala Ser Leu

280	285	290	
TAT GCC AGG CAG CAG CTG AAC GTC CGG AAT GTG GCC AAT AAA ATC TTG			1082
Tyr Ala Arg Gln Gln Leu Asn Val Arg Asn Val Ala Asn Lys Ile Leu			
295	300	305	
GCC ATT GCT GCT TTC TTG CCG GCG TGT CGC CCC CAC CTG CGA CGA TAT			1130
Ala Ile Ala Ala Phe Leu Pro Ala Cys Arg Pro His Leu Arg Arg Tyr			
310	315	320	325
TTC TGT GCC ATT GTC CAG CTG CCT TCT GAC TGG ATC CAG GTG GCT GAG			1178
Phe Cys Ala Ile Val Gln Leu Pro Ser Asp Trp Ile Gln Val Ala Glu			
330	335	340	
CTT TAC CAG AGC CTG GCT GAG GGA GAT AAG AAT AAG CTG GTG CCC CTG			1226
Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Glu Gly Asp Lys Asn Lys Leu Val Pro Leu			
345	350	355	
CCC GCC TGT CTC CGT ACT GCC ATG ACG GAC AAA TTT GCC CAG TTT GAC			1274
Pro Ala Cys Leu Arg Thr Ala Met Thr Asp Lys Phe Ala Gln Phe Asp			
360	365	370	
GAG TAC CAG CTG GCT AAG TAC AAC CCT CGG AAG CAC CGG GCC AAG AGA			1322
Glu Tyr Gln Leu Ala Lys Tyr Asn Pro Arg Lys His Arg Ala Lys Arg			
375	380	385	
CAC CCC CGC CGG CCA CCC CGC TCT CCA GGG ATG GAG CCT CCA TTT TCT			1370
His Pro Arg Arg Pro Pro Arg Ser Pro Gly Met Glu Pro Pro Phe Ser			
390	395	400	405
CAC AGA TGT TTT CCA AGG TAC ATA GGG TTT CTC AGA GAA GAG CAG AGA			1418
His Arg Cys Phe Pro Arg Tyr Ile Gly Phe Leu Arg Glu Glu Gln Arg			
410	415	420	
AAG TTT GAG AAG GCC GGT GAT ACA GTG TCA GAG AAA AAG AAT CCT CCA			1466
Lys Phe Glu Lys Ala Gly Asp Thr Val Ser Glu Lys Lys Asn Pro Pro			
425	430	435	

AGG TTC ACC CTG AAG AAG CTG GTT CAG CGA CTG CAC ATC CAC AAG CCT 1514
 Arg Phe Thr Leu Lys Lys Leu Val Gln Arg Leu His Ile His Lys Pro
 440 445 450
 GCC CAG CAC GTT CAA GCC CTG CTG GGT TAC AGA TAC CCC TCC AAC CTA 1562
 Ala Gln His Val Gln Ala Leu Leu Gly Tyr Arg Tyr Pro Ser Asn Leu
 455 460 465
 CAG CTC TTT TCT CGA AGT CGC CTT CCT GGG CCT TGG GAT TCT AGC AGA 1610
 Gln Leu Phe Ser Arg Ser Arg Leu Pro Gly Pro Trp Asp Ser Ser Arg
 470 475 480 485
 GCT GGG AAG AGG ATG AAG CTG TCT AGG CCA GAG ACC TGG GAG CGG GAG 1658
 Ala Gly Lys Arg Met Lys Leu Ser Arg Pro Glu Thr Trp Glu Arg Glu
 490 495 500
 CTG AGC CTA CGG GGG AAC AAA GCG TCG GTC TGG GAG GAA CTC ATT GAA 1706
 Leu Ser Leu Arg Gly Asn Lys Ala Ser Val Trp Glu Glu Leu Ile Glu
 505 510 515
 AAT GGG AAG CTT CCC TTC ATG GCC ATG CTT CGG AAC CTG TGC AAC CTG 1754
 Asn Gly Lys Leu Pro Phe Met Ala Met Leu Arg Asn Leu Cys Asn Leu
 520 525 530
 CTG CGG GTT GGA ATC AGT TCC CGC CAC CAT GAG CTC ATT CTC CAG AGA 1802
 Leu Arg Val Gly Ile Ser Ser Arg His His Glu Leu Ile Leu Gln Arg
 535 540 545
 CTC CAG CAT GCG AAG TCG GTG ATC CAC AGT CGG CAG TTT CCA TTC AGA 1850
 Leu Gln His Ala Lys Ser Val Ile His Ser Arg Gln Phe Pro Phe Arg
 550 555 560 565
 TTT CTT AAC GCC CAT GAT GCC ATT GAT GCC CTC GAG GCT CAA CTC AGA 1898
 Phe Leu Asn Ala His Asp Ala Ile Asp Ala Leu Glu Ala Gln Leu Arg
 570 575 580
 AAT CAA GCA TTG CCC TTT CCT TCG AAT ATA ACA CTG ATG AGG CGG ATA 1946

Asn Gln Ala Leu Pro Phe Pro Ser Asn Ile Thr Leu Met Arg Arg Ile
 585 590 595
 CTA ACT AGA AAT GAA AAG AAC CGT CCC AGG CGG AGG TTT CTT TGC CAC 1994
 Leu Thr Arg Asn Glu Lys Asn Arg Pro Arg Arg Arg Phe Leu Cys His
 600 605 610
 CTA AGC CGT CAG CAG CTT CGG ATG GCA ATG AGG ATA CCT GTG TTG TAT 2042
 Leu Ser Arg Gln Gln Leu Arg Met Ala Met Arg Ile Pro Val Leu Tyr
 615 620 625
 GAG CAG CTC AAG AGG GAG AAG CTG AGA GTA CAC AAG GCC AGA CAG TGG 2090
 Glu Gln Leu Lys Arg Glu Lys Leu Arg Val His Lys Ala Arg Gln Trp
 630 635 640 645
 AAA TAT GAT GGT GAG ATG CTG AAC AGG TAC CGA CAG GCC CTA GAG ACA 2138
 Lys Tyr Asp Gly Glu Met Leu Asn Arg Tyr Arg Gln Ala Leu Glu Thr
 650 655 660
 GCT GTG AAC CTC TCT GTG AAG CAC AGC CTG CCC CTG CTG CCA GGC CGC 2186
 Ala Val Asn Leu Ser Val Lys His Ser Leu Pro Leu Leu Pro Gly Arg
 665 670 675
 ACT GTC TTG GTC TAT CTG ACA GAT GCT AAT GCA GAC AGG CTC TGT CCA 2234
 Thr Val Leu Val Tyr Leu Thr Asp Ala Asn Ala Asp Arg Leu Cys Pro
 680 685 690
 AAG AGC AAC CCA CAA GGG CCC CCG CTG AAC TAT GCA CTG CTG TTG ATT 2282
 Lys Ser Asn Pro Gln Gly Pro Pro Leu Asn Tyr Ala Leu Leu Leu Ile
 695 700 705
 GGG ATG ATG ATC ACG AGG GCG GAG CAG GTG GAC GTC GTG CTG TGT GGA 2330
 Gly Met Met Ile Thr Arg Ala Glu Gln Val Asp Val Val Leu Cys Gly
 710 715 720 725
 GGT GAC ACT CTG AAG ACT GCA GTG CTT AAG GCA GAA GAA GGC ATC CTG 2378
 Gly Asp Thr Leu Lys Thr Ala Val Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ile Leu

730	735	740	
AAG ACT GCC ATC AAG CTC CAG GCT CAA GTC CAG GAG TTT GAT GAA AAT			2426
Lys Thr Ala Ile Lys Leu Gln Ala Gln Val Gln Glu Phe Asp Glu Asn			
745	750	755	
GAT GGA TGG TCC CTG AAT ACT TTT GGG AAA TAC CTG CTG TCT CTG GCT			2474
Asp Gly Trp Ser Leu Asn Thr Phe Gly Lys Tyr Leu Leu Ser Leu Ala			
760	765	770	
GGC CAA AGG GTT CCT GTG GAC AGG GTC ATC CTC CTT GGC CAA AGC ATG			2522
Gly Gln Arg Val Pro Val Asp Arg Val Ile Leu Leu Gly Gln Ser Met			
775	780	785	
GAT GAT GGA ATG ATA AAT GTG GCC AAA CAG CTT TAC TGG CAG CGT GTG			2570
Asp Asp Gly Met Ile Asn Val Ala Lys Gln Leu Tyr Trp Gln Arg Val			
790	795	800	805
AAT TCC AAG TGC CTC TTT GTT GGT ATC CTC CTA AGA AGG GTA CAA TAC			2618
Asn Ser Lys Cys Leu Phe Val Gly Ile Leu Leu Arg Arg Val Gln Tyr			
810	815	820	
CTG TCA ACA GAT TTG AAT CCC AAT GAT GTG ACA CTC TCA GGC TGT ACT			2666
Leu Ser Thr Asp Leu Asn Pro Asn Asp Val Thr Leu Ser Gly Cys Thr			
825	830	835	
GAT GCG ATA CTG AAG TTC ATT GCA GAG CAT GGG GCC TCC CAT CTT CTG			2714
Asp Ala Ile Leu Lys Phe Ile Ala Glu His Gly Ala Ser His Leu Leu			
840	845	850	
GAA CAT GTG GGC CAA ATG GAC AAA ATA TTC AAG ATT CCA CCA CCC CCA			2762
Glu His Val Gly Gln Met Asp Lys Ile Phe Lys Ile Pro Pro Pro Pro			
855	860	865	
GGA AAG ACA GGG GTC CAG TCT CTC CGG CCA CTG GAA GAG GAC ACT CCA			2810
Gly Lys Thr Gly Val Gln Ser Leu Arg Pro Leu Glu Glu Asp Thr Pro			
870	875	880	885

AGC CCC TTG GCT CCT GTT TCC CAG CAA GGA TGG GGC AGC ATC CGG CTT	2858
Ser Pro Leu Ala Pro Val Ser Gln Gln Gly Trp Gly Ser Ile Arg Leu	
890 895 900	
TTC ATT TCA TCC ACT TTC CGA GAC ATG CAC CGG GGA GCG GAC CTG CTG	2906
Phe Ile Ser Ser Thr Phe Arg Asp Met His Arg Gly Ala Asp Leu Leu	
905 910 915	
CTG AGG TCT GTG CTG CCA GCA CTG CAG GCC CGA GCG GCC CCT CAC CGT	2954
Leu Arg Ser Val Leu Pro Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Pro His Arg	
920 925 930	
ATC AGC CTT CAC CGA ATC GAC CTC CGC TGG GGC GTC ACT GAG GAG GAG	3002
Ile Ser Leu His Arg Ile Asp Leu Arg Trp Gly Val Thr Glu Glu Glu	
935 940 945	
ACC CGT AGG AAC AGA CAA CTG GAA GTG TGC CTT GGG GAG GTG GAG AAC	3050
Thr Arg Arg Asn Arg Gln Leu Glu Val Cys Leu Gly Glu Val Glu Asn	
950 955 960 965	
GCA CAG CTG TTT GTG GGG ATT CTG GGC TCC CGT TAT GGA AAC ATT CCC	3098
Ala Gln Leu Phe Val Gly Ile Leu Gly Ser Arg Tyr Gly Asn Ile Pro	
970 975 980	
CCC AGC TAC AAC CTT CCT GAC CAT CCA CAC TTC CAC TGG GCC CAG CAG	3146
Pro Ser Tyr Asn Leu Pro Asp His Pro His Phe His Trp Ala Gln Gln	
985 990 995	
TAC CCT TCA GGG CGC TCT GTG ACA GAG ATG GAG GTG ATG CAG TTC CTG	3194
Tyr Pro Ser Gly Arg Ser Val Thr Glu Met Glu Val Met Gln Phe Leu	
1000 1005 1010	
AAC CGG AAC CAA CGT CTG CAG CCC TCT GCC CAA GCT CTC ATC TAC TTC	3242
Asn Arg Asn Gln Arg Leu Gln Pro Ser Ala Gln Ala Leu Ile Tyr Phe	
1015 1020 1025	
CGG GAT TCC AGC TTC CTC AGC TCT GTG CCA GAT GCC TGG AAA TCT GAC	3290

Arg Asp Ser Ser Phe Leu Ser Ser Val Pro Asp Ala Trp Lys Ser Asp
 1030 1035 1040 1045
 TTT GTT TCT GAG TCT GAA GAG GCC GCA TGT CGG ATC TCA GAA CTG AAG 3338
 Phe Val Ser Glu Ser Glu Glu Ala Ala Cys Arg Ile Ser Glu Leu Lys
 1050 1055 1060
 AGC TAC CTA AGC AGA CAG AAA GGG ATA ACC TGC CGC AGA TAC CCC TGT 3386
 Ser Tyr Leu Ser Arg Gln Lys Gly Ile Thr Cys Arg Arg Tyr Pro Cys
 1065 1070 1075
 GAG TGG GGG GGT GTG GCA GCT GGC CGG CCC TAT GTT GGC GGG CTG GAG 3434
 Glu Trp Gly Gly Val Ala Ala Gly Arg Pro Tyr Val Gly Gly Leu Glu
 1080 1085 1090
 GAG TTT GGG CAG TTG GTT CTG CAG GAT GTA TGG AAT ATG ATC CAG AAG 3482
 Glu Phe Gly Gln Leu Val Leu Gln Asp Val Trp Asn Met Ile Gln Lys
 1095 1100 1105
 CTC TAC CTG CAG CCT GGG GCC CTG CTG GAG CAG CCA GTG TCC ATC CCA 3530
 Leu Tyr Leu Gln Pro Gly Ala Leu Leu Glu Gln Pro Val Ser Ile Pro
 1110 1115 1120 1125
 GAC GAT GAC TTG GTC CAG GCC ACC TTC CAG CAG CTG CAG AAG CCA CCG 3578
 Asp Asp Asp Leu Val Gln Ala Thr Phe Gln Gln Leu Gln Lys Pro Pro
 1130 1135 1140
 AGT CCT GCC CGG CCA CGC CTT CTT CAG GAC ACA GTG CAA CGG CTG ATG 3626
 Ser Pro Ala Arg Pro Arg Leu Leu Gln Asp Thr Val Gln Arg Leu Met
 1145 1150 1155
 CTG CCC CAC GGA AGG CTG AGC CTG GTG ACG GGG CAG TCA GGA CAG GGC 3674
 Leu Pro His Gly Arg Leu Ser Leu Val Thr Gly Gln Ser Gly Gln Gly
 1160 1165 1170
 AAG ACA GCC TTC CTG GCA TCT CTT GTG TCA GCC CTG CAG GCT CCT GAT 3722
 Lys Thr Ala Phe Leu Ala Ser Leu Val Ser Ala Leu Gln Ala Pro Asp

1175	1180	1185	
GGG GCC AAG GTG GCA CCA TTA GTC TTC TTC CAC TTT TCT GGG GCT CGT	3770		
Gly Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Phe Phe His Phe Ser Gly Ala Arg			
1190	1195	1200	1205
CCT GAC CAG GGT CTT GCC CTC ACT CTG CTC AGA CGC CTC TGT ACC TAT	3818		
Pro Asp Gln Gly Leu Ala Leu Thr Leu Leu Arg Arg Leu Cys Thr Tyr			
1210	1215	1220	
CTG CGT GGC CAA CTA AAA GAG TCA GGT GCC CTC CCC AGC ACC TAC CGA	3866		
Leu Arg Gly Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Leu Pro Ser Thr Tyr Arg			
1225	1230	1235	
AGC CTG GTG TGG GAG CTG CAG CAG AGG CTG CTG CCC AAG TCT GCT GAG	3914		
Ser Leu Val Trp Glu Leu Gln Gln Arg Leu Leu Pro Lys Ser Ala Glu			
1240	1245	1250	
TCC CTG CAT CCT GGC CAG ACC CAG GTC CTG ATC ATC GAT GGG GCT GAT	3962		
Ser Leu His Pro Gly Gln Thr Gln Val Leu Ile Ile Asp Gly Ala Asp			
1255	1260	1265	
AGG TTA GTG GAC CAG AAT GGG CAG CTG ATT TCA GAC TGG ATC CCA AAG	4010		
Arg Leu Val Asp Gln Asn Gly Gln Leu Ile Ser Asp Trp Ile Pro Lys			
1270	1275	1280	1285
AAG CTT CCC CGG TGT GTA CAC CTG GTG CTG AGT GTG TCT AGT GAT GCA	4058		
Lys Leu Pro Arg Cys Val His Leu Val Leu Ser Val Ser Ser Asp Ala			
1290	1295	1300	
GGC CTA GGG GAG ACC CTT GAG CAG AGC CAG GGT GCC CAC GTG CTG GCC	4106		
Gly Leu Gly Glu Thr Leu Glu Gln Ser Gln Gly Ala His Val Leu Ala			
1305	1310	1315	
TTG GGG CCT CTG GAG GCC TCT GCT CGG GCC CGG CTG GTG AGA GAG GAG	4154		
Leu Gly Pro Leu Glu Ala Ser Ala Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Glu			
1320	1325	1330	

CTG GCC CTG TAC GGG AAG CGG CTG GAG GAG TCA CCA TTT AAC AAC CAG 4202
 Leu Ala Leu Tyr Gly Lys Arg Leu Glu Glu Ser Pro Phe Asn Asn Gln
 1335 1340 1345
 ATG CGA CTG CTG CTG GTG AAG CGG GAA TCA GGC CGG CCG CTC TAC CTG 4250
 Met Arg Leu Leu Leu Val Lys Arg Glu Ser Gly Arg Pro Leu Tyr Leu
 1350 1355 1360 1365
 CGC TTG GTC ACC GAT CAC CTG AGG CTC TTC ACG CTG TAT GAG CAG GTG 4298
 Arg Leu Val Thr Asp His Leu Arg Leu Phe Thr Leu Tyr Glu Gln Val
 1370 1375 1380
 TCT GAG AGA CTC CGG ACC CTG CCT GCC ACT GTC CCC CTG CTG CAG CAC 4346
 Ser Glu Arg Leu Arg Thr Leu Pro Ala Thr Val Pro Leu Leu Gln His
 1385 1390 1395
 ATC CTG AGC ACA CTG GAG AAG GAG CAC GGG CCT GAT GTC CTT CCC CAG 4394
 Ile Leu Ser Thr Leu Glu Lys Glu His Gly Pro Asp Val Leu Pro Gln
 1400 1405 1410
 GCC TTG ACT GCC CTA GAA GTC ACA CGG AGT GGT TTG ACT GTG GAC CAG 4442
 Ala Leu Thr Ala Leu Glu Val Thr Arg Ser Gly Leu Thr Val Asp Gln
 1415 1420 1425
 CTG CAC GGA GTG CTG AGT GTG TGG CGG ACA CTA CCG AAG GGG ACT AAG 4490
 Leu His Gly Val Leu Ser Val Trp Arg Thr Leu Pro Lys Gly Thr Lys
 1430 1435 1440 1445
 ACC TGG GAA GAA GCA GTG GCT GCT GGT AAC AGT GGA GAC CCC TAC CCC 4538
 Thr Trp Glu Glu Ala Val Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Pro
 1450 1455 1460
 ATG GGC CCG TTT GCC TAC CTC GTC CAG AGT CTG CGC AGT TTG CTA GGG 4586
 Met Gly Pro Phe Ala Tyr Leu Val Gln Ser Leu Arg Ser Leu Leu Gly
 1465 1470 1475
 GAG GGC CCT CTG GAG CGC CCT GGT GCC CGG CTG TGC CTC CCT GAT GGG 4634

Glu Gly Pro Leu Glu Arg Pro Gly Ala Arg Leu Cys Leu Pro Asp Gly
 1480 1485 1490
 CCC CTG AGA ACA GCA GCT AAA CGT TGC TAT GGG AAG AGG CCA GGG CTA 4682
 Pro Leu Arg Thr Ala Ala Lys Arg Cys Tyr Gly Lys Arg Pro Gly Leu
 1495 1500 1505
 GAG GAC ACG GCA CAC ATC CTC ATT GCA GCT CAG CTC TGG AAG ACA TGT 4730
 Glu Asp Thr Ala His Ile Leu Ile Ala Ala Gln Leu Trp Lys Thr Cys
 1510 1515 1520 1525
 GAC GCT GAT GCC TCA GGC ACC TTC CGA AGT TGC CCT CCT GAG GCT CTG 4778
 Asp Ala Asp Ala Ser Gly Thr Phe Arg Ser Cys Pro Pro Glu Ala Leu
 1530 1535 1540
 GGA GAC CTG CCT TAC CAC CTG CTC CAG AGC GGG AAC CGT GGA CTT CTT 4826
 Gly Asp Leu Pro Tyr His Leu Leu Gln Ser Gly Asn Arg Gly Leu Leu
 1545 1550 1555
 TCG AAG TTC CTT ACC AAC CTC CAT GTG GTG GCT GCA CAC TTG GAA TTG 4874
 Ser Lys Phe Leu Thr Asn Leu His Val Val Ala Ala His Leu Glu Leu
 1560 1565 1570
 GGT CTG GTC TCT CGG CTC TTG GAG GCC CAT GCC CTC TAT GCT TCT TCA 4922
 Gly Leu Val Ser Arg Leu Leu Glu Ala His Ala Leu Tyr Ala Ser Ser
 1575 1580 1585
 GTC CCC AAA GAG GAA CAA AAG CTC CCC GAG GCT GAC GTT GCA GTG TTT 4970
 Val Pro Lys Glu Glu Gln Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Ala Val Phe
 1590 1595 1600 1605
 CGC ACC TTC CTG AGG CAG CAG GCT TCA ATC CTC AGC CAG TAC CCC CGG 5018
 Arg Thr Phe Leu Arg Gln Gln Ala Ser Ile Leu Ser Gln Tyr Pro Arg
 1610 1615 1620
 CTC CTG CCC CAG CAG GCA GCC AAC CAG CCC CTG GAC TCA CCT CTT TGC 5066
 Leu Leu Pro Gln Gln Ala Ala Asn Gln Pro Leu Asp Ser Pro Leu Cys

1625	1630	1635	
CAC CAA GCC TCG CTG CTC TCC CGG AGA TGG CAC CTC CAA CAC ACA CTA			5114
His Gln Ala Ser Leu Leu Ser Arg Arg Trp His Leu Gln His Thr Leu			
1640	1645	1650	
CGA TGG CTT AAT AAA CCC CGG ACC ATG AAA AAT CAG CAA AGC TCC AGC			5162
Arg Trp Leu Asn Lys Pro Arg Thr Met Lys Asn Gln Gln Ser Ser Ser			
1655	1660	1665	
CTG TCT CTG GCA GTT TCC TCA TCC CCT ACT GCT GTG GCC TTC TCC ACC			5210
Leu Ser Leu Ala Val Ser Ser Ser Pro Thr Ala Val Ala Phe Ser Thr			
1670	1675	1680	1685
AAT GGG CAA AGA GCA GCT GTG GGC ACT GCC AAT GGG ACA GTT TAC CTG			5258
Asn Gly Gln Arg Ala Ala Val Gly Thr Ala Asn Gly Thr Val Tyr Leu			
1690	1695	1700	
TTG GAC CTG AGA ACT TGG CAG GAG GAG AAG TCT GTG GTG AGT GGC TGT			5306
Leu Asp Leu Arg Thr Trp Gln Glu Glu Lys Ser Val Val Ser Gly Cys			
1705	1710	1715	
GAT GGA ATC TCT GCT TGT TTG TTC CTC TCC GAT GAC ACA CTC TTT CTT			5354
Asp Gly Ile Ser Ala Cys Leu Phe Leu Ser Asp Asp Thr Leu Phe Leu			
1720	1725	1730	
ACT GCC TTC GAC GGG CTC CTG GAG CTC TGG GAC CTG CAG CAT GGT TGT			5402
Thr Ala Phe Asp Gly Leu Leu Glu Leu Trp Asp Leu Gln His Gly Cys			
1735	1740	1745	
CGG GTG CTG CAG ACT AAG GCT CAC CAG TAC CAA ATC ACT GGC TGC TGC			5450
Arg Val Leu Gln Thr Lys Ala His Gln Tyr Gln Ile Thr Gly Cys Cys			
1750	1755	1760	1765
CTG AGC CCA GAC TGC CGG CTG CTA GCC ACC GTG TGC TTG GGA GGA TGC			5498
Leu Ser Pro Asp Cys Arg Leu Leu Ala Thr Val Cys Leu Gly Gly Cys			
1770	1775	1780	

CTA AAG CTG TGG GAC ACA GTC CGT GGG CAG CTG GCC TTC CAG CAC ACC	5546
Leu Lys Leu Trp Asp Thr Val Arg Gly Gln Leu Ala Phe Gln His Thr	
1785 1790 1795	
TAC CCC AAG TCC CTG AAC TGT GTT GCC TTC CAC CCA GAG GGG CAG GTA	5594
Tyr Pro Lys Ser Leu Asn Cys Val Ala Phe His Pro Glu Gly Gln Val	
1800 1805 1810	
ATA GCC ACA GGC AGC TGG GCT GGC AGC ATC AGC TTC TTC CAG GTG GAT	5642
Ile Ala Thr Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ile Ser Phe Phe Gln Val Asp	
1815 1820 1825	
GGG CTC AAA GTC ACC AAG GGA CCT GGG GGC CCC GGA GCC TCT ATC CGT	5690
Gly Leu Lys Val Thr Lys Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ser Ile Arg	
1830 1835 1840 1845	
ACC TTG GCC TTC AAT GTG CCT GGG GGG GTT GTG GCT GTG GGC CGG CTG	5738
Thr Leu Ala Phe Asn Val Pro Gly Gly Val Val Ala Val Gly Arg Leu	
1850 1855 1860	
GAC AGT ATG GTG GAG CTG TGG GCC TGG CGA GAA GGG GCA CGG CTG GCT	5786
Asp Ser Met Val Glu Leu Trp Ala Trp Arg Glu Gly Ala Arg Leu Ala	
1865 1870 1875	
GCC TTC CCT GCC CAC CAT GGC TTT GTT GCT GCT GCG CTT TTC CTG CAT	5834
Ala Phe Pro Ala His His Gly Phe Val Ala Ala Ala Leu Phe Leu His	
1880 1885 1890	
GCG GGT TGC CAG TTA CTG ACG GCT GGA GAG GAT GGC AAG GTT CAG GTG	5882
Ala Gly Cys Gln Leu Leu Thr Ala Gly Glu Asp Gly Lys Val Gln Val	
1895 1900 1905	
TGG TCA GGG TCT CTG GGT CGG CCC CGT GGG CAC CTG GGT TCC CTT TCT	5930
Trp Ser Gly Ser Leu Gly Arg Pro Arg Gly His Leu Gly Ser Leu Ser	
1910 1915 1920 1925	
CTC TCT CCT GCC CTC TCT GTG GCA CTC AGC CCA GAT GGT GAT CGG GTG	5978

Leu Ser Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Ser Pro Asp Gly Asp Arg Val
 1930 1935 1940
 GCT GTT GGA TAT CGA GCG GAT GGC ATT AGG ATC TAC AAA ATC TCT TCA 6026
 Ala Val Gly Tyr Arg Ala Asp Gly Ile Arg Ile Tyr Lys Ile Ser Ser
 1945 1950 1955
 GGT TCC CAG GGG GCT CAG GGT CAG GCA CTG GAT GTG GCA GTG TCG GCC 6074
 Gly Ser Gln Gly Ala Gln Gly Gln Ala Leu Asp Val Ala Val Ser Ala
 1960 1965 1970
 CTG GCC TGG ATA AGC CCC AAG GTA TTG GTG AGT GGT GCA GAA GAT GGG 6122
 Leu Ala Trp Ile Ser Pro Lys Val Leu Val Ser Gly Ala Glu Asp Gly
 1975 1980 1985
 TCC TTG CAG GGC TGG GCA CTC AAG GAA TGC TCC CTT CAG TCC CTC TGG 6170
 Ser Leu Gln Gly Trp Ala Leu Lys Glu Cys Ser Leu Gln Ser Leu Trp
 1990 1995 2000 2005
 CTC CTG TCC AGA TTC CAG AAG CCT GTG CTA GGA CTG GCC ACT TCC CAG 6218
 Leu Leu Ser Arg Phe Gln Lys Pro Val Leu Gly Leu Ala Thr Ser Gln
 2010 2015 2020
 GAG CTC TTG GCT TCT GCC TCA GAG GAT TTC ACA GTG CAG CTG TGG CCA 6266
 Glu Leu Leu Ala Ser Ala Ser Glu Asp Phe Thr Val Gln Leu Trp Pro
 2025 2030 2035
 AGG CAG CTG CTG ACG CGG CCA CAC AAG GCA GAA GAC TTT CCC TGT GGC 6314
 Arg Gln Leu Leu Thr Arg Pro His Lys Ala Glu Asp Phe Pro Cys Gly
 2040 2045 2050
 ACT GAG CTG CGG GGA CAT GAG GGC CCT GTG AGC TGC TGT AGT TTC AGC 6362
 Thr Glu Leu Arg Gly His Glu Gly Pro Val Ser Cys Cys Ser Phe Ser
 2055 2060 2065
 ACT GAT GGA GGC AGC CTG GCC ACC GGG GGC CGG GAT CGG AGT CTC CTC 6410
 Thr Asp Gly Gly Ser Leu Ala Thr Gly Gly Arg Asp Arg Ser Leu Leu

2070	2075	2080	2085	
TGC TGG GAC GTG AGG ACA CCC AAA ACC CCT GTT TTG ATC CAC TCC TTC				6458
Cys Trp Asp Val Arg Thr Pro Lys Thr Pro Val Leu Ile His Ser Phe				
	2090	2095	2100	
	CCT GCC TGT CAC CGT GAC TGG GTC ACT GGC TGT GCC TGG ACC AAA GAT			6506
	Pro Ala Cys His Arg Asp Trp Val Thr Gly Cys Ala Trp Thr Lys Asp			
	2105	2110	2115	
	AAC CTA CTG ATA TCC TGC TCC AGT GAT GGC TCT GTG GGG CTC TGG GAC			6554
	Asn Leu Leu Ile Ser Cys Ser Ser Asp Gly Ser Val Gly Leu Trp Asp			
	2120	2125	2130	
	CCA GAG TCA GGA CAG CGG CTT GGT CAG TTC CTG GGT CAT CAG AGT GCT			6602
	Pro Glu Ser Gly Gln Arg Leu Gly Gln Phe Leu Gly His Gln Ser Ala			
	2135	2140	2145	
	GTG AGC GCT GTG GCA GCT GTG GAG GAG CAC GTG GTG TCT GTG AGC CGG			6650
	Val Ser Ala Val Ala Ala Val Glu Glu His Val Val Ser Val Ser Arg			
	2150	2155	2160	2165
	GAT GGG ACC TTG AAA GTG TGG GAC CAT CAA GGC GTG GAG CTG ACC AGC			6698
	Asp Gly Thr Leu Lys Val Trp Asp His Gln Gly Val Glu Leu Thr Ser			
	2170	2175	2180	
	ATC CCT GCT CAC TCA GGA CCC ATT AGC CAC TGT GCA GCT GCC ATG GAG			6746
	Ile Pro Ala His Ser Gly Pro Ile Ser His Cys Ala Ala Ala Met Glu			
	2185	2190	2195	
	CCC CGT GCA GCT GGA CAG CCT GGG TCA GAG CTT CTG GTG GTA ACC ATC			6794
	Pro Arg Ala Ala Gly Gln Pro Gly Ser Glu Leu Leu Val Val Thr Ile			
	2200	2205	2210	
	GGG CTA GAT GGG GCC ACA CGG TTA TGG CAT CCA CTC TTG GTG TGC CAA			6842
	Gly Leu Asp Gly Ala Thr Arg Leu Trp His Pro Leu Leu Val Cys Gln			
	2215	2220	2225	

ACC CAC ACC CTC CTG GGA CAC AGC GGC CCA GTC CGT GCT GCT GCT GTT 6890
 Thr His Thr Leu Leu Gly His Ser Gly Pro Val Arg Ala Ala Ala Val
 2230 2235 2240 2245
 TCA GAA ACC TCA GCC CTC ATG CTG ACC GCC TCT GAG ATG TCT GTA CGG 6938
 Ser Glu Thr Ser Ala Leu Met Leu Thr Ala Ser Glu Met Ser Val Arg
 2250 2255 2260
 CTC TGG CAG GTT CCT AAG GAA GCA GAT GAC ACA TGT ATA CCA AGG AGT 6986
 Leu Trp Gln Val Pro Lys Glu Ala Asp Asp Thr Cys Ile Pro Arg Ser
 2265 2270 2275
 TCT GCA GCC GTC ACT GCT GTG GCT TGG GCA CCA GAT GGC TCC ATG GCA 7034
 Ser Ala Ala Val Thr Ala Val Ala Trp Ala Pro Asp Gly Ser Met Ala
 2280 2285 2290
 GTA TCT GGA AAT CAA GCT GGG GAA CTA ATC TTG TGG CAG GAA GCT AAG 7082
 Val Ser Gly Asn Gln Ala Gly Glu Leu Ile Leu Trp Gln Glu Ala Lys
 2295 2300 2305
 GCT GTG GCC ACA GCA CAG GCT CCA GGC CAC ATA GGT GCT CTG ATC TGG 7130
 Ala Val Ala Thr Ala Gln Ala Pro Gly His Ile Gly Ala Leu Ile Trp
 2310 2315 2320 2325
 TCC TCG GCA CAC ACC TTT TTT GTC CTC AGT GCT GAT GAG AAA ATC AGC 7178
 Ser Ser Ala His Thr Phe Phe Val Leu Ser Ala Asp Glu Lys Ile Ser
 2330 2335 2340
 GAG TGG CAA GTG AAA CTG CGA GAG GGT TCG GCA CCC GGA AAT TTG AGT 7226
 Glu Trp Gln Val Lys Leu Arg Lys Gly Ser Ala Pro Gly Asn Leu Ser
 2345 2350 2355
 CTT CAC CTG AAC CGA ATT CTA CAG GAG GAC TTA GGG GTG CTG ACA AGT 7274
 Leu His Leu Asn Arg Ile Leu Gln Glu Asp Leu Gly Val Leu Thr Ser
 2360 2365 2370
 CTG GAT TGG GCT CCT GAT GGT CAC TTT CTC ATC TTG GCC AAA GCA GAT 7322

Leu Asp Trp Ala Pro Asp Gly His Phe Leu Ile Leu Ala Lys Ala Asp
 2375 2380 2385
 TTG AAG TTA CTT TGC ATG AAG CCA GGG GAT GCT CCA TCT GAA ATC TGG 7370
 Leu Lys Leu Leu Cys Met Lys Pro Gly Asp Ala Pro Ser Glu Ile Trp
 2390 2395 2400 2405
 AGC AGC TAT ACA GAA AAT CCT ATG ATA TTG TCC ACC CAC AAG GAA TAT 7418
 Ser Ser Tyr Thr Glu Asn Pro Met Ile Leu Ser Thr His Lys Glu Tyr
 2410 2415 2420
 GGC ATA TTT GTC CTG CAG CCC AAG GAT CCT GGA GTT CTT TCT TTC TTG 7466
 Gly Ile Phe Val Leu Gln Pro Lys Asp Pro Gly Val Leu Ser Phe Leu
 2425 2430 2435
 AGG CAA AAG GAA TCA GGA AAG TTT GAA GAG AGG CTG AAC TTT GAT ATA 7514
 Arg Gln Lys Glu Ser Gly Lys Phe Glu Glu Arg Leu Asn Phe Asp Ile
 2440 2445 2450
 AAC TTA GAG AAT CCT AGT AGG ACC CTA ATA TCG ATA ACT CAA GCC AAA 7562
 Asn Leu Glu Asn Pro Ser Arg Thr Leu Ile Ser Ile Thr Gln Ala Lys
 2455 2460 2465
 CCT GAA TCT GAG TCC TCA TTT TTG TGT GCC AGC TCT GAT GGG ATG CTA 7610
 Pro Glu Ser Glu Ser Ser Phe Leu Cys Ala Ser Ser Asp Gly Met Leu
 2470 2475 2480 2485
 TGG AAC CTG GCC AAA TGC AGC CCA GAA GGA GAA TGG ACC ACA GGT AAC 7658
 Trp Asn Leu Ala Lys Cys Ser Pro Glu Gly Glu Trp Thr Thr Gly Asn
 2490 2495 2500
 ATG TGG CAG AAA AAA GCA AAC ACT CCA GAA ACC CAA ACT CCA GGG ACA 7706
 Met Trp Gln Lys Lys Ala Asn Thr Pro Glu Thr Gln Thr Pro Gly Thr
 2505 2510 2515
 GAC CCA TCT ACC TGC AGG GAA TCT GAT GCC AGC ATG GAT AGT GAT GCC 7754
 Asp Pro Ser Thr Cys Arg Glu Ser Asp Ala Ser Met Asp Ser Asp Ala

2520	2525	2530	
AGC ATG GAT AGT GAG CCA ACA CCA CAT CTA AAG ACA CGG CAG CGT AGA			7802
Ser Met Asp Ser Glu Pro Thr Pro His Leu Lys Thr Arg Gln Arg Arg			
2535	2540	2545	
AAG ATT CAC TCG GGC TCT GTC ACA GCC CTC CAT GTG CTA CCT GAG TTG			7850
Lys Ile His Ser Gly Ser Val Thr Ala Leu His Val Leu Pro Glu Leu			
2550	2555	2560	2565
CTG GTG ACA GCT TCG AAG GAC AGA GAT GTT AAG CTA TGG GAG AGA CCC			7898
Leu Val Thr Ala Ser Lys Asp Arg Asp Val Lys Leu Trp Glu Arg Pro			
2570	2575	2580	
AGT ATG CAG CTG CTG GGC CTG TTC CGA TGC GAA GGG TCA GTG AGC TGC			7946
Ser Met Gln Leu Leu Gly Leu Phe Arg Cys Glu Gly Ser Val Ser Cys			
2585	2590	2595	
CTG GAA CCT TGG CTG GGC GCT AAC TCC ACC CTG CAG CTT GCC GTG GGA			7994
Leu Glu Pro Trp Leu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Gln Leu Ala Val Gly			
2600	2605	2610	
GAC GTG CAG GGC AAT GTG TAC TTT CTG AAT TGG GAA TGAAGATGTG			8040
Asp Val Gln Gly Asn Val Tyr Phe Leu Asn Trp Glu ***			
2615	2620	2625	
CCACTCGGGA ATAATGATAC CCCTTGTGCT AGAGATGCAA AGCCTGAAGA CACTGGTAGC			8100
TTTAAATAAT TATAAAATTA ATAATTCTT GATAATTATA AAAATGAAGT GTCAAAAAAT			8160
CTCAAGTGTA GGCCTGCCTG TGTTCATG TGGATTAGA ACAGGAGGAT ATTCTATGTG			8220
TATGTATATG TACATTCTAA TGTGTGCTC TTCTTATTCA ACATTAATCC TTACTAGAAC			8280
CACAAGAAAG TGAATGAAAT CTTAGTAGG TACTCTTTTG AACTAGGTT TTAGAATTCT			8340
TGCATCACTC GCGGGCCCTA GGACCCTAGG ATGCCATTCT TGCCAGGAGG AGGAATGAGA			8400
GTGATGTTGG CCAACATTCA ATTTGAACAG AGCATGGAAG ACCTTTCAGT TCATCGGGAA			8460
AGAATGAGGG AGGGAGAATA AGTCAGTCAT GCATCAGGGC ATTTAGAAAG AGCTATGTTT			8520
CTGTCACAGA GACAGCCCTT TTCTCAGAAC TACCCAGAGG AGGCCGGGCA TGGTGGCTCA			8580

CGCTTGTAAT CCCAGCACTT TGGGAGGCCG AGGTGGGCAG ATCACGAGGT CAGGAGATCA 8640
AGACCATCCT GGCTAACATA GTGAAACCCT GTCTCTACTA AAAAATACAA AAAGTTGGCC 8700
AGGTGTGGCG GCGGGCACCT GTAGTCCCAG CTA CTCTGGGA GGCTGAGGCA GGAGAATGGC 8760
GTGAACCCAG GAGGCCGAGC TTGCGGTGAG CCGAGACACC ACTGCACTCC AGCCTGGGCA 8820
ACAGAGCGAG ACTCTGTCT 8839

請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で特定されるポリペプチド。
2. ラット由来テロメラーゼ蛋白質である請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチド。
3. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質として機能することを特徴とするポリペプチド。
4. ヒトの生体内でテロメラーゼ蛋白質として機能することができる請求の範囲第 3 項に記載のポリペプチド。
5. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で特定されるポリペプチド。
6. ヒト由来テロメラーゼ蛋白質の部分ポリペプチドである請求の範囲第 5 項に記載のポリペプチド。
7. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質の部分ポリペプチドとして機能することを特徴とするポリペプチド。
8. 配列表の配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列で特定されるポリペプチド。
9. ヒト由来テロメラーゼ蛋白質である請求の範囲第 8 項に記載のポリペプチド。
10. 配列表の配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列に 1 又は 2 以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、実質的にヒトを含む高等動物テロメラーゼ蛋白質として機能することを特徴とするポリペプチド。
11. ヒトの生体内でテロメラーゼ蛋白質として機能することができる請求の範囲第 10 項に記載のポリペプチド。
12. 請求の範囲第 1 項ないし 11 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。
13. DNA 配列又は RNA 配列である請求の範囲第 12 項に記載のヌクレオチド配列。
14. 請求の範囲第 13 項に記載の DNA 配列を含む組み換えベクター。

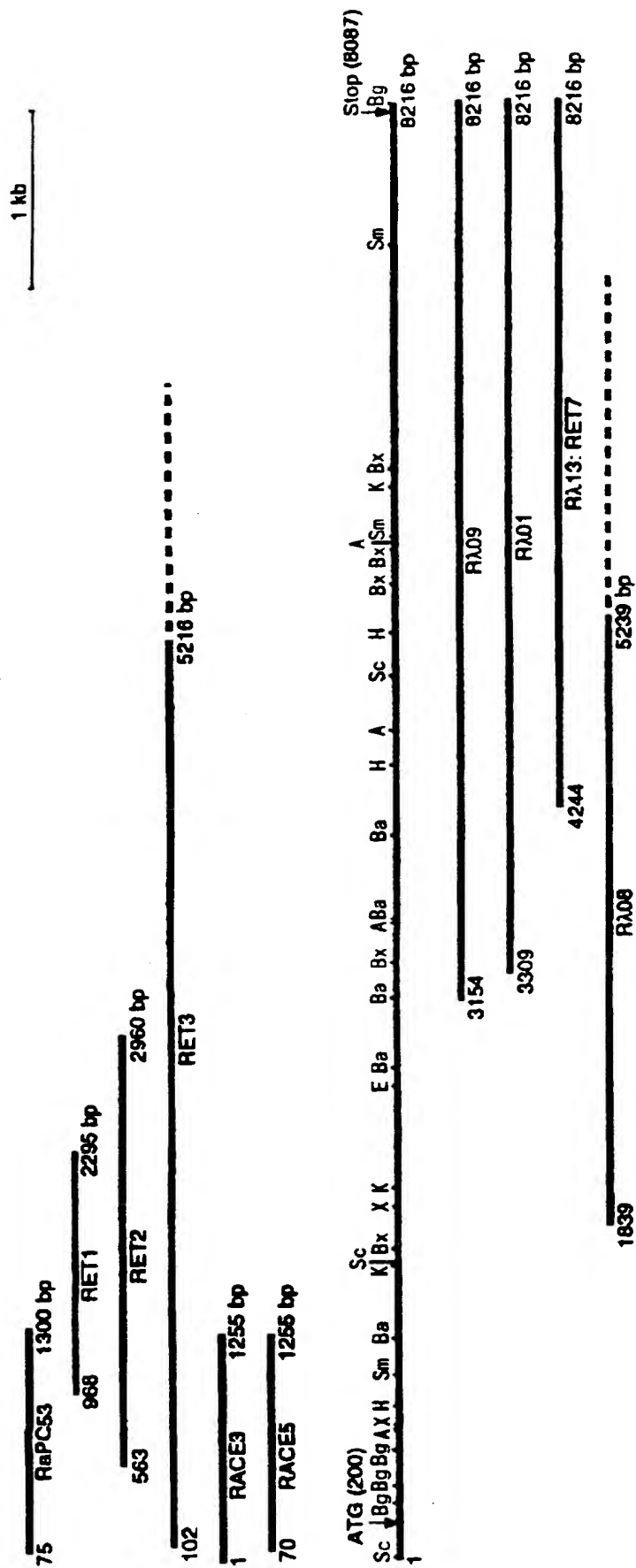
15. 請求の範囲第14項に記載の組み換えベクターが導入された形質転換体。
16. 請求の範囲第15項に記載の形質転換体を培養した培養物から請求の範囲第13項に記載のDNA配列の遺伝子産物であるポリペプチドを分離・採取する工程を含む、請求の範囲第1項ないし11項のいずれか1項に記載のポリペプチドの製造方法。
17. 請求の範囲第1項ないし11項のいずれか1項に記載のポリペプチドを特異的に認識することができる抗体。
18. 請求の範囲第12項に記載のヌクレオチド配列の一部又は全部に相補的に結合可能なヌクレオチドを含む核酸プローブ。
19. 請求の範囲第17項に記載の抗体又は請求の範囲第18項に記載の核酸プローブを含む癌細胞検出用試薬。
20. 請求の範囲第17項に記載の抗体又は請求の範囲第18項に記載の核酸プローブを含む癌診断用の医薬組成物。
21. 請求の範囲第3項又は10項に記載のポリペプチドをサブユニットとして含む高等動物テロメラーゼ蛋白質。
22. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が、不活性型では約240kDaであり、活性型では約230kDaであることを特徴とする請求の範囲第3項に記載のポリペプチド。
23. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量が約230kDaであることを特徴とする活性型の請求の範囲第3項に記載のポリペプチド。
24. 高等動物テロメラーゼ蛋白質の酵素活性発現に作用する物質のスクリーニング方法であって、被験物質と接触させた細胞又は組織に含まれるテロメラーゼ蛋白質またはそのサブユニットの分子量を測定する工程を含むスクリーニング方法。
25. 被験物質との接触工程を被験物質の存在下における培養工程又は動物への被験物質の投与工程により行う請求の範囲第24項に記載のスクリーニング方法。
26. 分子量の測定をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で行う請求の範囲第24項又は25項に記載のスクリーニング方法。
27. 約240kDaの不活性型及び約230kDaの活性型のポリペプチドの存在

比を測定する工程を含む請求の範囲第26項に記載のスクリーニング方法。

28. 被験物質の非存在下における240kDaのポリペプチドの存在比と比較して、該ポリペプチドの存在比が被験物質の存在下において実質的に増加している場合には、該被験物質が高等動物テロメラーゼ蛋白質の酵素活性の発現を阻害する物質であると判定する工程を含む請求の範囲第26項又は27項に記載のスクリーニング方法。

29. 被験物質の非存在下における230kDaのポリペプチドの存在比と比較して、該ポリペプチドの存在比が被験物質の存在下において実質的に増加している場合には、該被験物質が高等動物テロメラーゼ蛋白質の酵素活性の発現を活性化する物質であると判定する工程を含む請求の範囲第26項又は27項に記載のスクリーニング方法。

30. 請求の範囲第1項又は第3項に記載のポリペプチドの分子量を測定する工程を含む請求の範囲第24項ないし29項のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。

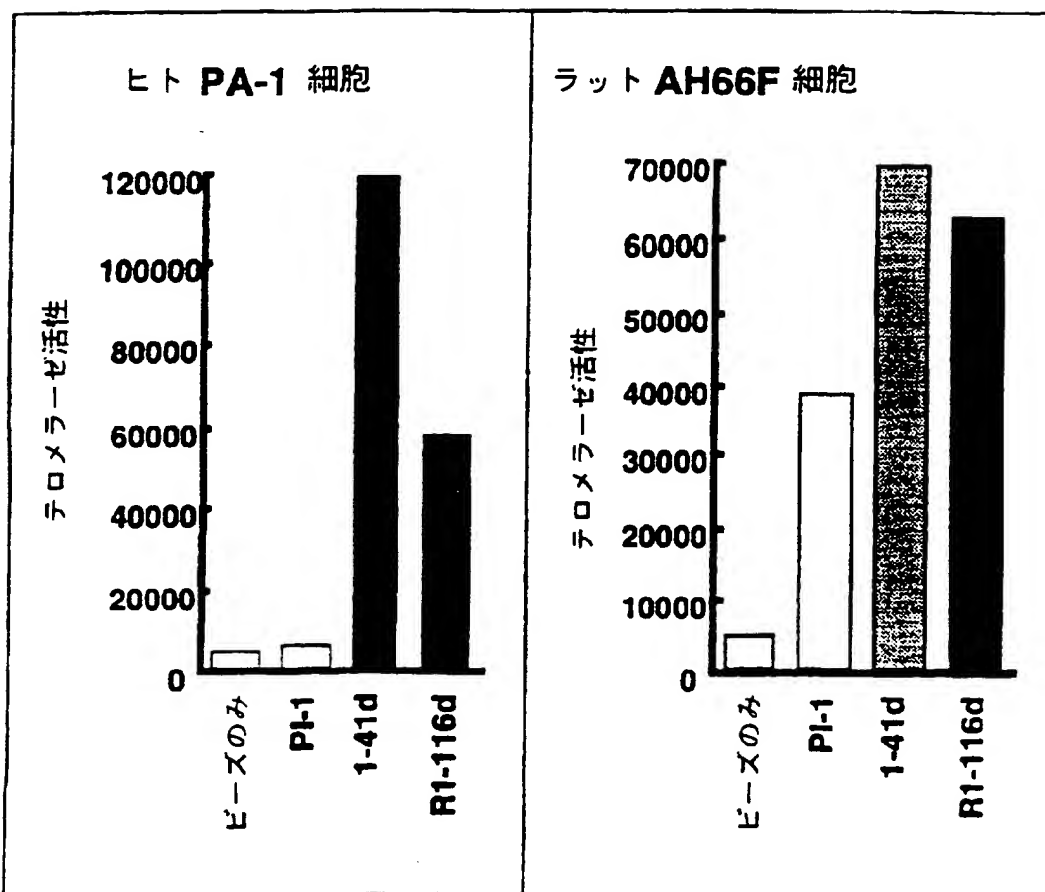


第 1 図

第2図

		10	20	30	40	50	
R	1	AAATTTGCCG	AGTTTGAAGA	GTACCAGCTA	GCGAAGTACA	ACCCGCGGAA	50
H	1	AAATTTGCCG	AGTTTGAAGA	GTACCAGCTG	GCTAAGTACA	ACCCGCGGAA	50
		60	70	80	90	100	
R	51	AACACGATCG	AAGACAGGTT	GGGUCAGCG	ACCCGCGCGT	CAGAGGACAA	100
H	51	GACCGGCGCG	AAGAGAGACC	GGGCGCGCG	ACCCGCGCTG	CCGCGGATGG	100
		110	120	130	140	150	
R	101	AGCCTCCATT	TTGAGCGAGT	GGGAAATGTT	TTCCAAAGAG	CGTTTGGCCC	150
H	101	AGCCTCCATT	TTGTCACAG	-----ATGTT	TTCCAAGATA	CATAGCGTTT	150
		160	170	180	190	200	
R	151	CTTAAACCG	AACAGATTTC	CTTCAAGCA	CGTTAATATG	CAGTGTGAGA	200
H	151	CTCAGAGAG	AGGAGAGAAA	CTTCAAGAG	CGCGGAGATA	CAGTGTGAGA	200
		210	220	230	240	250	
R	201	GAACAAACCG	CTAACAAGGT	TCAGTCTGAA	GAAGTGGGA	GAGCAAGTGC	250
H	201	GAAAAAGGAT	CTCAACAAGT	TCAGCTGAA	GAAGCTGGTT	CAGCGACTGC	250
		260	270	280	290	300	
R	251	ATATCCATGA	GCCTGGCGAG	CATGTCGAGG	CCCTGCTGGG	CTACAGGTAC	300
H	251	ACATCCACAA	GCCTGGCCAG	CACCTTCAAG	CCCTGCTGGG	TTACAGATAC	300
		310	320	330	340	350	
R	301	CGATCCACCG	TAGAGGCTTT	TTCTCGGAGT	CATCTCCTTG	GGGCAATGGGA	350
H	301	CGCTCCAACG	TACAGGCTTT	TTCTCGGAGT	CGCCTTCTTG	GGGCTTGGGA	350
		360	370	380	390	400	
R	351	CTCTAGCAGG	GCTGGCGTAC	CGATGAAGCT	CCAAAGGCCA	CAGACCTGGG	400
H	351	TTCTAGCAGA	GCTGGGAGAG	CGATGAAGCT	GTCTAGGCCA	CAGACCTGGG	400
		410	420	430	440	450	
R	401	AGCGGGAGCT	GAGGCTACCT	GGAAACAGAG	TTCTCTGGTG	GGAGGAAGTC	450
H	401	AGCGGGAGCT	GAGGCTACCT	GGAAACAGAG	GTCTCTCTTG	GGAGGAAGTC	450
		460	470	480	490	500	
R	451	ATAGACAATG	GGAAATCTCG	CTTCATGGCC	ATGCTCCGCA	ACT.....	500
H	451	ATAGACAATG	GGAAATCTCG	CTTCATGGCC	ATGCTCCGCA	TCT.....	500
		10	20	30	40	50	
p80	1	KFSEENFYOL	GKYCTESQK	KMFAYLSVT	NKQKWDQTKK	KRKENLLTKL	50
R	1	KFAQDFEYOL	AKYNPRKHHS	KTRSS-----	-----	-----	50
H	1	KFAQDFEYOL	AKYNPRKHHA	KRHP-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
p80	51	QAIKESEDKS	KRETGDIMNV	EDAIKALKPA	VMKKIAKRON	AMKKHMAPB	100
R	51	-----	-----QELPP	QRTKSPFSES	GKCFPKSVNP	LKNGLISSEA	100
H	51	-----	-----RPPHS	PGMEPPPHH-	-RPPERYIGF	PREGRSEER	100
		110	120	130	140	150	
p80	101	IPSTLESFK	ITFKDILFC	HISEPKRVY	KILGKKYPKT	EEEYKAAPGD	150
R	101	MYAVSEKPR	LPRFTLKKIA	EQLIHHPAC	HVQALLGYRY	PSTLELFERS	150
H	101	AGDTVSEKKN	PPBFTLKKIA	ORLIHHPAC	HVQALLGYRY	PSNLOLFERS	150
		160	170	180	190	200	
p80	151	SASAFNPFL	AGKKELEIS	KIKNFSAK	NTAEVNDNL	ISSNQLYFA	200
R	151	HLPGPNDSSN	AGQMKLQRE	ETWERELSLF	GRASVNEEL	IONGKLPPMA	200
H	151	RLPGPNDSSN	AGKPKLSRE	ETWERELSLF	GRASVNEEL	IONGKLPPMA	200
		210	220	230	240	250	
p80	201	MLR.....	250
R	201	MLRN.....	250
H	201	MLSI.....	250

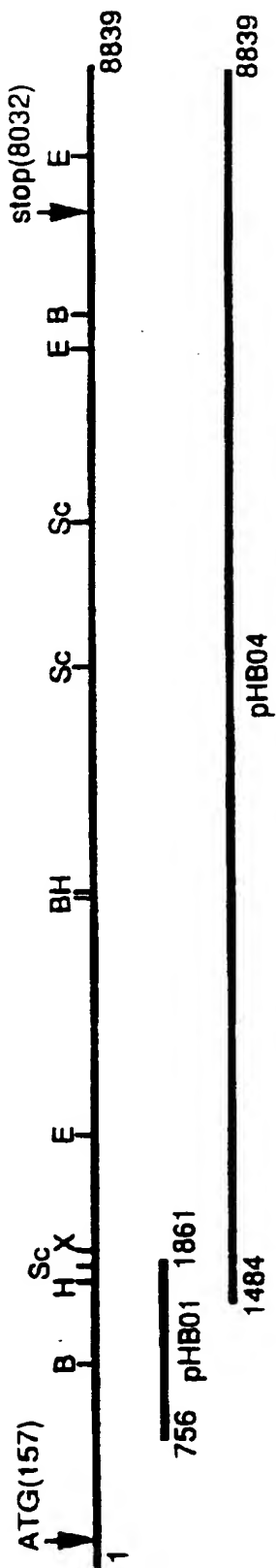
第3図



第 4 図

1 kb

1 RACE-L4 1046



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N9/12, C12N15/54, C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N9/12, C12N15/54, C12Q1/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Medline, Biosis Previews, GenBank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell, Vol. 81, (1995), Collins K. et al. "Purification of Tetrahymena Telomerase and Cloning of Genes Encoding the Two Protein Components of the Enzyme" p. 677-686	1 - 30
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, H33937, Lee. N.H. et al. 'Comparative expressed sequence tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment' 08 September 1995	1 - 30
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 92, (1995) Prowse K.R. et al. "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length" p. 4818-4822	1 - 30
A	Cell, Vol. 59, (1989), Morin G.B. "The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is a Ribonucleoprotein That Synthesizes TTAGGG Repeats" p. 521-529	1 - 30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search September 30, 1997 (30. 09. 97)	Date of mailing of the international search report October 7, 1997 (07. 10. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Molecular Biology of the Cell, 7 (Suppl.), (1996), Nakayama J. et al. "Cloning of a candidate cDNA encoding a preteinaceous component of mammalian telomerase" p. 286A	1 - 30
P,X	Science, Vol. 276, (1997) Linger J. et al. "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase" p. 561-566	1 - 30
P,X	Cell, Vol. 88, (1977), Nakayama J. et al. "TLP1:A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family" p. 875-884	1 - 30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/12, C12N15/54, C12Q1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/12, C12N15/54, C12Q1/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline, Biosis Previews, GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cell, 第81巻, (1995), Collins K. et al. [Purification of Tetrahymena Telomerase and Cloning of Genes Encoding the Two Protein Components of the Enzyme] p. 677-686	1-30
A	Database GenBank Rel. 100, National Center for Biotechnology Information, H33937, Lee, N. H. et al. 'Comparative expressed sequence tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment' 08. 9月. 1995	1-30
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 第92巻, (1995) Prowse K. R. et al. [Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length] p. 4818-4822	1-30
A	Cell, 第59巻, (1989), Morin G. B. [The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is a Ribonucleoprotein That Synthesizes TTAGGG Repeats] p. 521-529	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 09. 97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便 号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4 B

7 8 2 3

印

平 田 和 男

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Molecular Biolofy of the Cell. 7 (SUPPL.), (1996), Nakayama J. et al「Cloning of a candidate cDNA encoding a preteinaceous component of mammalian telomerase」p. 286A	1-30
P, X	Science, 第276巻, (1997) Linger J. et al「Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase」p. 561-566	1-30
P, X	Cell, 第88巻, (1997), Nakayama J. et al「TLP1:A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family」p. 875-884	1-30